

**Rekonstitution der DNA-abhängigen RNA-Polymerase
aus isolierten Untereinheiten, eine Methode zur
Untersuchung der Funktion der Untereinheiten
in der Transsscription**

Alfred Heil
—

1973
—

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München-Martinsried
Abteilung Molekulare Biologie der Genwirkung
Direktor: Professor Dr. W. Zillig

Rekonstitution der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus
isolierten Untereinheiten, eine Methode zur Untersu-
chung der Funktion der Untereinheiten in der Trans-
scription

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alfred Heil
aus München

1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Bücher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 6. 1973



Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Die Struktur der Folypolymere

2. Die Funktion der Katalysatoren bei der Polymerisation

II. Ergebnisse von Zillig

1. Eigenschaften der Polymeren bei der Polymerisation

1. Trennung der Katalysatoren

2. Art der Katalysatoren

3. Art der bei der Katalysatorbildung auftretenden Ionen

4. Wirkung von p_2 bei der Polymerisation

5. Wirkung der Katalysatoren bei der Polymerisation

6. Schluss

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Zillig im Max-Planck-Institut für Biochemie, München, durchgeführt.

III. Zusammenfassung

IV. Literaturverzeichnis

1. Zillig

2. Zillig

3. Zillig

4. Zillig

5. Zillig

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt und Herrn Prof. Dr. W. Zillig danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

6. Wirkung von p_2 auf die Polymerisation

7. Zillig

8. Wirkung von Katalysatoren bei der Polymerisation

9. Zillig

10. Zillig

11. Zillig

12. Zillig

13. Zillig

14. Zillig

INHALTSÜBERSICHT

Abkürzungen

A. Einleitung	1
1. Die Struktur der Polymerase	6
2. Die Funktion der Untereinheiten der Polymerase	7
B. Ergebnisse und Diskussion	
I. <u>Präparation der Untereinheiten der Polymerase</u>	11
1. Trennung der Untereinheiten	11
2. Art der denaturierenden Mittel	14
3. Art der bei der Denaturierung anwesenden Ionen	14
4. Einfluß des p_H bei der Enzymspaltung	18
5. Einfluß der Ionenstärke bei der Enzymspaltung	20
6. Stabilität der Untereinheiten	20
II. <u>Rekonstitution der RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten</u>	25
1. Essentielle Faktoren bei der Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten	26
2. Faktoren, die die Rekonstitution stimulieren	29
a) Strukturbestandteile des Enzyms	29
b) Wirkung von Substrat und DNA auf die Rekonstitution	33
3. Kinetik und Temperaturabhängigkeit der Rekonstitution	34
4. Einfluß des Mischungsverhältnisses der Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz auf die Rekonstitutionsausbeute	39
5. Abhängigkeit der Rekonstitutionsausbeute von der Proteinkonzentration	41
6. Abhängigkeit der Rekonstitutionsausbeute von der Zusammensetzung des Rekonstitutionspuffers	44

III. <u>Nachweis der Identität des rekonstituierten Enzyms</u>	
<u>mit Polymerase</u>	46

IV. <u>Gemischte Rekonstitution der Polymerase aus isolier-</u>	
<u>ten Untereinheiten als Mittel zur Aufklärung der</u>	
<u>Funktion der Untereinheiten in der Transcription</u>	51

C. Material und Methoden	
1. Bezugsquellen	57
2. Zucht von Bakterien	57
3. Zucht und Reinigung von T ₄ - und T ₅ -Phagen	58
4. Pufferlösungen	58
5. Quantitative Bestimmungsmethoden	59
6. Präparative Methoden	61
7. Spezielle Methoden	61

D. Zusammenfassung	63
--------------------	----

E. Literatur	66
--------------	----

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
m-RNA	"messenger"- oder Matrizenribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
T ₄ -DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bakteriophagen T ₄
T ₅ -DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bakteriophagen T ₅
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
UTP	Uridin- 5'-Triphosphat
CTP	Cytidin- 5'-Triphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Svedbergeinheit (10^{-13} sec.)
V/V	Volumenverhältnis
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TMA	Tris-Magnesium-Ammonium-Puffer (S. 58)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
TCA	Trichloressigsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute
DTT	Dithiothreitol
mU.	milli Unit (= nMol AMP-Einbau pro Minute)
MgAc ₂	Magnesiumacetat
PPO	2, 5-Diphenyloxazol
POPOP	1, 4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol

Einleitung

Die Eigenschaften lebender Zellen wie Vererbung und Vermehrung, Wachstum und Differenzierung, Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und Altern sind das Ergebnis chemischer und physikalischer Wechselwirkungen von Molekülen und Ionen. Durch Einsatz entsprechender Methoden an einfachen Modellorganismen, insbesondere an Bakterien und Viren ist die exakte Beschreibung und Analyse von bis dahin nur formal erkannten Lebensphänomenen ermöglicht worden.

Die in der molekularen Genetik an diesen Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse zur Expression der genetischen Information lassen sich zunehmend auf höhere Organismen übertragen.

Für Bakterien wie für pflanzliche und tierische Zellen gilt formal, daß die in der DNA gespeicherte genetische Information (1) erst dann für die Zelle verfügbar und ein Merkmal wird, wenn sie aus dieser Speicherform im Verlauf der Transskription übergeführt wird in die Funktionsform, die m-RNA (2,3), die der Proteinsyntheseapparat der Zelle, Ribosomen, Faktoren und t-RNA, ablesen kann, um durch die sogenannte Translation aktivierte Aminosäuren zu funktionsfähigem Protein zu verknüpfen.

Der formale Ablauf der Genwirkungen ist bei einfachen Systemen im molekularen Bereich z. T. bis in Einzelheiten bekannt. Obwohl man viele, wenn auch noch nicht alle, Zusammenhänge beschreiben kann, hat man noch wenig Einsicht in die Mechanismen dieser Reaktionen und in die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der dabei beteiligten Moleküle. Daher sind Untersuchungen an einfachen biologischen Modellsystemen nicht nur immer noch gerechtfertigt, sondern auch notwendig. Das trifft auch für den im Vergleich zur Translation einfachen Vorgang der Transskription zu. Um die an diesem Schritt eingreifenden Regulationsvorgänge besser verstehen zu können, und weil es sich um den ersten entscheidenden Schritt der

Genexpression handelt, ist es sinnvoll, die Analyse dieses Prozesses bis ins Detail zu verfolgen.

Durch die Entdeckung des Enzyms, das die Synthese der RNA katalysiert, durch Weiß und Hurwitz in Leberchromatin (4) bzw. E.coli-Bakterien (5), wurde es möglich, diesen Vorgang, der in der lebenden Zelle sehr unübersichtlich abläuft und von anderen Ereignissen überlagert wird, an denen die bei der Transskription beteiligten Komponenten ebenfalls teilnehmen, in vitro auf seine essentiellen Bestandteile zu reduzieren, seinen formalen Ablauf zu studieren und zu beginnen, die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der Reaktionspartner zu untersuchen.

Essentielle Komponenten des Transskriptionssystems in vitro

Dieses Enzym, die Transscriptase oder DNA-abhängige RNA-Polymerase, oder im Folgenden auch kurz Polymerase⁺ genannt, kann rein dargestellt werden und benötigt in vitro zur Katalyse der RNA-Synthese nur eine Matriz (DNA), vier Substrate (ATP, GTP, CTP und UTP) und die Anwesenheit zweiwertiger Metallionen, besonders Magnesium (6,7,8). Entsprechend der Basensequenz der Matriz werden die Ribonucleosidtriphosphate unter Abspaltung von Pyrophosphat zu einer dem sogenannten codogenen Strang der DNA komplementären Kopie verknüpft (9,10). DNA und Enzym sind am Ende dieser Reaktion unverändert.

Regulation der RNA-Synthese

Die Zelle macht aber in vivo nur selektiven Gebrauch vom genetischen Potential, das in der DNA gespeichert ist. Dieses Phänomen bezeichnet man als Regulation. Je nach Differenzierungsgrad oder Funktionszustand werden bestimmte Abschnitte der DNA transskribiert, damit an dieser m-RNA die dazugehörigen Genprodukte synthetisiert werden können, welche zum Aufbau von Zellstrukturen und zur Ausübung der Funktionen notwendig sind. Die einem genetischen Merk-

⁺ = Nucleosidtriphosphat: RNA-Nucleotidyltransferase EC 2.7.7.6

mal entsprechende m-RNA hat daher nur einen Bruchteil der Länge der gesamten DNA. Auch die insgesamt synthetisierte RNA entspricht nur einem Teil der im Chromosom gespeicherten Information. Also muß die Polymerase Anfang und Ende von Leseeinheiten (Operons) erkennen können, in bestimmten Situationen bestimmte Bereiche der DNA ablesen und einen der beiden DNA-Stränge als codogenen Strang auswählen.

Diese Bedingungen sind bei den bekannten Transcriptionssystemen in vitro aber nur teilweise erfüllt. Z. B. ist zwar bekannt, daß an nativer T_4 -DNA in vitro asymmetrisch transskribiert wird (11), und es gelingt auch die Synthese von m-RNA, die den sogenannten unmittelbar frühen Genen des T_4 -Phagen zugeordnet werden kann (12), aber eine Transcription des gesamten Phagengenoms durch E.coli-Polymerase ist in vitro noch nicht gelungen.

Genetische Befunde deuten darauf hin, daß die Regulation der RNA-Synthese in vivo einer Reihe verschiedener Mechanismen unterworfen ist. Zwei prinzipielle Möglichkeiten der Regulation der RNA-Synthese konnten bisher nachgewiesen werden.

Externe Faktoren, aus zellfreien Überständen isoliert, können dem gereinigten System zugesetzt werden und stimulieren (σ , M, CAP) (13, 14, 15) bzw. hemmen (ρ , Repressor) (16, 17) entweder spezifisch oder unspezifisch die RNA-Synthese. So konnte man an Genen, die der Katabolitenrepression unterliegen wie z. B. dem lac-Operon, in vitro durch Zusatz von Induktor, Repressor und Faktoren, die Bedingungen herstellen, unter denen in vivo lac-spezifische m-RNA synthetisiert wird (18).

Aber auch eine chemische Modifikation der Polymerase selbst und der die RNA-Synthese regulierenden Faktoren z. B. durch Infektion von E.coli-Bakterien mit T_4 -Phagen (19, 20) oder die Neusynthese einer Phagenspezifischen Polymerase wie z. B. nach Infektion von E.coli mit T_7 - bzw. T_3 -Phagen (21, 22), kann zur Regulation der RNA-Synthese beitragen. Erst durch diese Mechanismen ist die phagen-infizierte Zelle in der Lage, späte Phagengene zu transskribieren. Im Falle der T_4 -Phagen ist offensichtlich zusätzlich die Synthese

Phagenspezifischer Genprodukte erforderlich (23, 24).

Voraussetzung für ein Verständnis der Regulation der Transskription ist aber zunächst eine genaue Kenntnis des im gereinigten System ablaufenden Transskriptionsvorgangs.

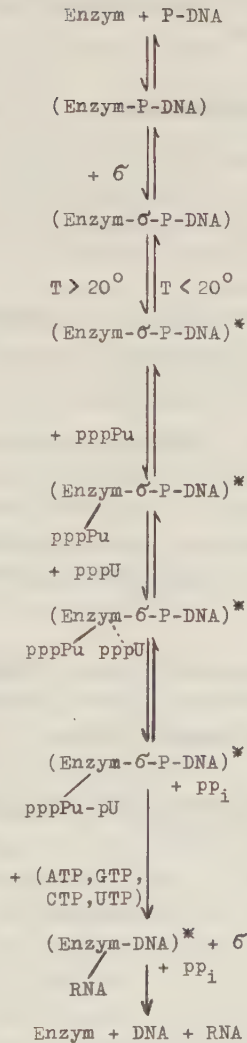
Der formale Ablauf der Transskription ist, obwohl nur von einem einzigen Enzym katalysiert, verhältnismäßig kompliziert, und verläuft als eine Reihe von aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten nach folgendem Schema:

Legende zu Schema I:

- Enzym = Basalenzym
- P-DNA = Promotorregion der DNA
- pppPu = Purinnucleosidtriphosphat
- pppU = UTP (wird bei Transskription an T₄-DNA als zweites Nucleotid eingebaut)
- pp_i = anorg. Pyrophosphat

Schema I: Formaler Ablauf der Transskription (S. 5)

1. primäre Bindung der Polymerase an DNA
2. Bildung des Initiationskomplexes (Komplex 2)
3. Bildung des aktivierten Initiationskomplexes (Komplex 3)
4. Bindung des ersten Purinnucleosidtriphosphats an den Komplex 3
5. zusätzliche Bindung von pppU
6. Verknüpfung der beiden ersten Nucleosidtriphosphate, Abspaltung von Pyrophosphat
7. Translokation des Enzyms, Anlagerung weiterer Nucleosidtriphosphate und deren Verknüpfung
8. Termination



sensitiv gegen	stabil gegen
Heparin Rifampicin	
Heparin Rifampicin	
Heparin Rifampicin	
Rifampicin (abgeschwächt)	Heparin
	Rifampicin
Streptolydigin	Rifampicin
Streptolydigin	

Damit die im Folgenden dargestellten Resultate in die bekannten Fakten eingeordnet werden können, sei zunächst zusammengefaßt, was wir über die Beziehungen von Struktur und Funktion der Polymerase wissen.

1. Die Struktur der Polymerase

Die Polymerase ist ein Protein, das bei niederer Ionenstärke (0, 10) als Dimer vorliegt mit einem Molekulargewicht von 960 000 Dalton und einer Sedimentationskonstanten von 24 S (25, 26).

Bei hoher Ionenstärke (0, 5) zerfällt das Dimer in Monomere mit einem Molekulargewicht von 480 000 Dalton und einer Sedimentationskonstanten von 13 S. Zwischen den beiden Formen besteht ein schnelles Gleichgewicht, dessen Lage von der Ionenstärke abhängt (27).

Durch 6 M Harnstoff, 1 % SDS oder Erhöhung des p_H über 10 wird das Enzymmonomer in fünf Untereinheiten dissoziiert, von denen zwei identisch sind, wie durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen oder Celluloseacetat nachgewiesen werden konnte (28, 29, 30). Diese Untereinheiten unterscheiden sich durch Ladung und Molekulargewicht.

Ordnet man die Untereinheiten nach abnehmender Wanderungsgeschwindigkeit in der Cellogelelektrophorese, die überwiegend nach Ladung trennt, erhält man folgendes Schema:

Tabelle 1: Molekulargewichte der Untereinheiten der RNA-Polymerase aus E.coli (28)

Bezeichnung der UE	Molekulargewicht	Mol UE/Mol Monomer
ϵ	85 000	1
α	40 000	2
β	155 000	1
β'	160 000	1

Eine weitere Spaltung der Untereinheiten durch Reduktion, Alkylierung unter reduzierenden Bedingungen und Oxydation ist nicht möglich (30), was den Schluß zuläßt, daß die Untereinheiten Polypeptidketten sind. Die Spaltbarkeit des Enzyms in Unterein-

heiten durch Wasserstoffbrücken-sprengende Agentien beweis, daß diese Polypeptidketten nicht durch kovalente Bindungen zusammen gehalten werden. Für das Enzymmonomer ergibt sich also die Bruttoformel $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Ob eine weitere Proteinbande, ω (Molekulargewicht 12 000), die sich in gereinigten Enzympräparationen findet, ein Bestandteil der Polymerase ist, konnte noch nicht geklärt werden. Es erscheint möglich, daß ω nur eine Verunreinigung darstellt, die wegen ihrer stark negativen Ladung an die Polymerase gebunden und mit dem Enzym angereichert wird. Die Aktivität der Polymerase im Standard-Test ist unabhängig vom Gehalt an ω (28).

2. Die Funktion der Untereinheiten der Polymerase

Es bieten sich prinzipiell zwei Möglichkeiten an, bestimmte Enzymfunktionen einzelnen Untereinheiten zuzuordnen:

- 1) Isolierung einzelner, nativer Untereinheiten und direkter Test auf ihre Funktion.
- 2) Inhibition einzelner Funktionen am Gesamtzym und Bestimmung des Angriffsorts der Hemmung.

Einer Untersuchung der Funktion einzelner Untereinheiten an isolierten Untereinheiten selbst stehen eine Reihe von Schwierigkeiten entgegen:

- 1) Darstellung reiner nativer Untereinheiten und Nachweis ihrer nativen Konformation.
- 2) Nachweis der Identität der Konformation der Untereinheit im isolierten Zustand und im Enzymverband.
- 3) Es können nur solche Funktionen getestet werden, für deren Ablauf nicht die Vollendung vorausgegangener Reaktionsschritte Voraussetzung ist.
- 4) Einer Untersuchung an isolierten Untereinheiten entgehen alle Partialfunktionen, für die eine Kooperation mehrerer Untereinheiten erforderlich ist.

Bei der Untersuchung von Partialfunktionen einzelner Untereinheiten am Gesamtzym tauchen folgende Probleme auf:

- 1) Spezifität der Inhibitoren; nur bestimmte Reaktionsschritte sollen blockiert werden.

- 2) Bereitstellung verschiedener Inhibitoren durch die Partialfunktionen testbar werden.
- 3) Bestimmung des Angriffsorts der Inhibitoren.

I) σ nimmt in dieser Betrachtung eine Sonderstellung ein, da es ohne Anwendung denaturierender Agentien schon durch Chromatographie an Phosphoryl-Cellulose vom Basal- oder core-Enzym ($\alpha_{2BB'}$) abgetrennt werden kann (29). Das Basalenzym ist nicht mehr in der Lage, an nativer T_2 - oder T_4 -DNA RNA-Synthese zu initiieren, obwohl es noch binden kann. Erst durch Zusatz von σ erhält es die ursprüngliche Aktivität des Vollenzyms wieder (31). In Synthese begriffenes Enzym ist Basalenzym. σ ist also für die Initiation zuständig. Nach der Initiation wird σ freigesetzt und kann wiederum Basalenzym zur Initiation veranlassen (13). An einsträngiger DNA oder defekter DNA mit Strangbrüchen oder freien Enden kann Basalenzym auch in Abwesenheit von σ unspezifisch initiieren (31), während durch σ -haltiges Enzym an nativer DNA asymmetrisch transskribiert wird (32).

II) Obwohl man α verhältnismäßig leicht in sehr wahrscheinlich nativer Form isolieren kann (33), ist bisher noch kein Test bekannt, durch den es einer Partialfunktion zugeordnet werden könnte. Möglicherweise ist α u. a. für die Promotorspezifität der Polymerase verantwortlich; denn bei der Alteration des Enzyms in T_4 -Phagen-infizierten Zellen, die offenbar die Abschaltung der Wirtstranskription bewirkt, aber die Transskription der frühen Phagengene nur quantitativ beeinflusst (34), wird die Polymerase durch Anlagerung eines Adenosinrestes und zweier Phosphatreste chemisch verändert (35).

III) Zur Aufklärung der Funktion von β lieferte die Wirkungsweise des Antibiotikums Rifampicin (36), eines Derivats von Rifamycin, einen wesentlichen Beitrag. Rifampicin bildet mit normaler Polymerase aus E.coli einen stabilen Komplex (37). Dadurch wird ein Schritt in der Initiation gehemmt, der vor der Knüpfung der ersten Internucleotidbindung stattfindet. Rifampicin hemmt nicht die Bindung der Polymerase an die DNA und nicht die Elongation der RNA-Kette (36, 38, 39). Außerdem ist bekannt, daß Rifampicin, obwohl es die Initiation hemmt, nicht an σ , sondern unmittelbar am Basalenzym angreift (38).

Die Polymerase aus Rifampicin-resistenten Mutanten von E.coli bindet den Inhibitor nicht und wird in vitro auch bei Anwesenheit größerer Mengen Rifampicin nicht gehemmt (37). Unter den aus fünf Rifampicin-resistenten Mutanten gewonnenen Enzymen befand sich eins, das sich vom Wildtyp-Enzym durch eine veränderte Ladung der β -Untereinheit unterschied (40). Den endgültigen Beweis, daß β für die Rifampicinresistenz verantwortlich ist, konnte Rabussay erbringen, indem er zeigte, daß β aus resistentem Enzym kein radioaktives Rifampicin binden konnte, während das Rifampicin-sensitive β aus Wildtyp-Polymerase pro Molekül ein Molekül Rifampicin zu binden vermochte (40). β ist also die Rifampicin-bindende Untereinheit. Nachdem Rifampicin einen Schritt in der Initiation hemmt, muß β an der Initiation beteiligt sein.

An einsträngiger DNA findet RNA-Synthese auch in Abwesenheit von σ statt; trotzdem wird auch bei Verwendung von Basalenzym die RNA-Synthese durch Rifampicin vollständig gehemmt (41). Es ist daher die Annahme berechtigt, daß Rifampicin durch Bindung an β einen Initiationsschritt blockiert, in dem σ keine Rolle spielt, obwohl das Antibiotikum am aktivierten Komplex (Enzym- σ -DNA)^{*} angreift. In diesem Schritt könnte nach Goldthwait et al. (42) Rifampicin die Bindung des ersten Purinribonucleosidtriphosphats in nicht kompetitiver Weise verhindern. Eine Funktion von β in der Initiation wäre somit die Bindung des ersten Purinribonucleosidtriphosphats, wobei σ nicht erforderlich ist.

Da man bei der Spaltung von Holoenzym mittels Lithiumchlorid einen $\sigma\beta$ Komplex findet (43), hat man geschlossen, daß β der Bindungsort für σ am Enzym ist. Auch β -haltige Enzymfragmente, z. B. $\alpha_2\beta$ oder $\alpha\beta_2$ (33) sind in der Lage, σ zu binden. Nachdem σ selbst nicht mit DNA in Wechselwirkung tritt, übt es über β seine Initiationsfunktion offenbar als Effektor auf das Gesamtenzym aus (44).

Auch die Befunde von Losick et al. (45) an Polymerase aus vegetativen und sporulierenden B. subtilis-Zellen scheinen dafür zu sprechen, daß β die σ -bindende Untereinheit darstellt. Das core-Enzym aus sporulierenden B. subtilis kann nämlich im Gegensatz zu Polymerase aus vegetativen Zellen - wahrscheinlich wegen seiner veränderten

β -Untereinheit - nicht mehr durch σ aus vegetativen *B. subtilis*-Zellen stimuliert werden. Also ist β wahrscheinlich in zweifacher Hinsicht an der Enzymfunktion beteiligt:

- 1) β bindet σ und ermöglicht so in der Initiation die Bildung des aktivierten Komplexes (Enzym-o-DNA)*.
- 2) β ist an der Bindung des ersten Purinribonucleosidtriphosphats in der Initiation beteiligt.

IV) Die Untereinheit β' ist neben σ , welches eine Sonderstellung einnimmt, die einzige Untereinheit, deren Funktion direkt überprüft werden konnte. Es konnte gezeigt werden, daß freies β' an DNA bindet (46), während umgekehrt β' -freie Partialkomplexe nicht in der Lage sind, an DNA zu binden (33). Wahrscheinlich ist auch, daß sich schon Basalenzym ohne Mithilfe von σ an spezifische Bindungsorte (Promotoren) der DNA anheftet (33). Ob jedoch β' allein schon diese spezifischen Bindungsorte erkennt oder ob dazu die Mitwirkung anderer Untereinheiten nötig ist, bleibt noch unklar.

Eine allgemein anwendbare Möglichkeit, die Funktion einzelner Untereinheiten im Enzymverband zu testen besteht darin, veränderte Enzyme mit bekannten enzymologischen Eigenschaften z. B. aus verschiedenen mutanten Bakterienstämmen oder nach chemischer Modifikation in ihre Untereinheiten zu zerlegen, diese anschließend mit Wildtyp-Untereinheiten zu Vollenzymen zu rekonstituieren (= gemischte Rekonstitution) und nun mittels geeigneter Tests, strukturelle Modifikation und enzymologische Funktion zu korrelieren (47).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist

- 1) Präparation reiner Untereinheiten der Polymerase, die sich wieder zu aktivem Enzym rekonstituieren lassen
- 2) Erarbeitung optimaler Bedingungen für die Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten
- 3) Anwendung der Methode der gemischten Rekonstitution zur Bestimmung der Enzym-Untereinheiten, die für die Wirkungen der Antibiotika Streptolydigin und Rifampicin verantwortlich sind.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kapitel I: Präparation der Untereinheiten der Polymerase

1. Trennung der Untereinheiten

Die Reindarstellung sämtlicher Untereinheiten der Polymerase gelang bisher nicht ohne Anwendung denaturierender Agentien und in präparativem Maßstab nur mittels Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen bzw. -blöcken in 6 M Harnstoff enthaltendem Puffer (28). Diese zur Spaltung des Enzyms notwendige Behandlung führte dazu, daß die Verwendung der so gewonnenen Untereinheiten sich überwiegend auf proteinchemische Analysen beschränkte.

Versuche zur Renaturierung der einzelnen Polypeptidketten waren zwar für α und β erfolgreich, wenn man als Kriterium für native Konformation die Löslichkeit bzw. elektrophoretische Beweglichkeit in harnstofffreiem Puffer ansieht (28, 33). Es gelang jedoch nur in Sonderfällen, anhand von enzymologischen oder physikalischen Tests, Hinweise zu gewinnen, daß wenigstens eine partielle Renaturierung einzelner Untereinheiten gelungen war. So ließ sich an isoliertem β die Fähigkeit zur Bindung von Rifampicin (40) und an β' die Bindung von DNA nachweisen (46). Erst die Experimente von Lill und Hartmann (48) zeigten, daß eine Denaturierung der Polymerase infolge der Behandlung mit 6,5 M Harnstoff genauso reversibel ist wie man es von anderen Enzymen schon seit langem kennt. (47, 50, 51, 52) Lill und Hartmann konnten durch Entfernung des denaturierenden Agens bis zu 50 % der Ausgangsaktivität wiedergewinnen.

Dieses Ergebnis war die Anregung zu Versuchen, Untereinheiten der Polymerase durch Elektrophorese auf Celluloseacetat in harnstoffhaltigem Puffer zu isolieren und diese wieder zu aktivem Enzym zu rekonstituieren. Vorausgegangene Experimente zur Gewinnung einzelner nativer Enzym-Untereinheiten aus polymerasefreien Bakterienextrakten verliefen erfolglos, weil für die Anreicherung solcher Untereinheiten kein geeigneter Test zur Verfügung stand.

Da die gemischte Rekonstitution nur mit reinen Untereinheiten sinnvoll durchzuführen ist, war auch die von Sethi entwickelte Methode zur Präparation von Untereinheiten durch Spaltung der Polymerase mit LiCl ungeeignet, obwohl eine anschließende Rekonstitution bis zu 25 % der Ausgangsaktivität möglich war (43, 44). Infolge der zur Dissoziation des Enzyms mit LiCl verwendeten hohen Ionenstärke konnten die Untereinheiten nicht mehr nach Ladung, sondern nur noch aufgrund von Molekulargewichtsunterschieden präparativ getrennt werden. Die Trennung nach Molekulargewicht lieferte aber, wie auch Versuche nach Spaltung des Enzyms mit 6 M Harnstoff bei p_H 9 (53) oder mit 1 % SDS (29) zeigten, sowohl nach Auftrennung über Sephadex als auch im Sucrosegradienten keine chemisch reinen Untereinheiten. Zwar gelang es auf diese Weise α rein zu isolieren, jedoch ließen sich β und β' nicht voneinander trennen, entweder weil sie wegen ihres geringen Molekulargewichtsunterschieds kosedimentieren oder weil sie sehr leicht als Komplex auftreten. Die Trennmethode nach Molekulargewicht führen außerdem zu einer starken Verdünnung der Proteinlösung, die einen Konzentrierungsschritt durch Ammonsulfatfällung erfordert. Nach Präzipitation mit Ammonsulfat sind jedoch partiell denaturierte Untereinheiten, besonders β' in Neutralpuffer (S.59) schwer wieder in Lösung zu bringen.

Als weiterer Nachteil bei der Trennung der Untereinheiten z. B. im Sucrosegradienten ist der verhältnismäßig große Zeitaufwand zu betrachten, weil dabei die Proteine ständig den denaturierenden Bedingungen ausgesetzt sein müssen. Es soll später noch darauf eingegangen werden (S.20), daß die Dauer der Einwirkung des denaturierenden Agens von Bedeutung für die Rekonstituierbarkeit ist.

Für eine präparative Trennung erschien die Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen oder -blöcken in 6 M Harnstoff aus drei Gründen als die geeignete Methode:

- 1) Die Ladungsunterschiede der Untereinheiten gewährleisten eine saubere Trennung. (Abb. 1)
- 2) Die zur Trennung erforderliche Zeit beträgt maximal 3 - 4 Stunden.
- 3) Die Untereinheiten können in ausreichend hoher Konzentration und Ausbeute ohne zusätzlichen Konzentrierungsschritt gewonnen werden.

Die methodischen Einzelheiten der Präparation von Untereinheiten mittels Cellogelelektrophorese werden im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben.

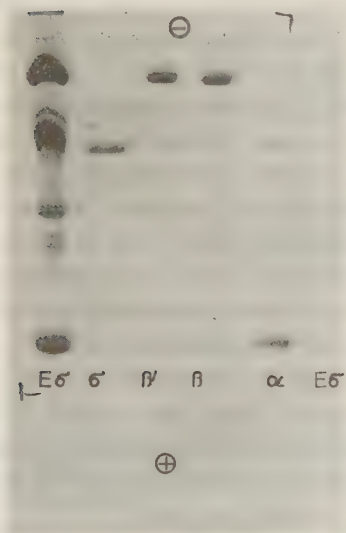


Abb. 1: Reinheitsprüfung der isolierten Untereinheiten der RNA-Polymerase durch Elektrophorese in SDS-Polyacrylamid-Gel (83).

Gewinnung der Untereinheiten nach Trennung in NH_4HCO_3 -Harnstoffpuffer bei $\text{pH} = 9$ wie auf S. 62 beschrieben.

E5 = Vollenzym als Referenz

Wie die erfolgreiche Renaturierung der Polymerase (48) und anderer Enzyme (49, 50, 52) zeigt, läßt sich prinzipiell die Wirkung denaturierender Agentien rückgängig machen. Jedoch wurde die theoretisch mögliche 100 %ige Ausbeute an renaturiertem und biologisch aktivem Enzym in der Praxis nur selten erreicht (54). Neben den später zu besprechenden Bedingungen der Rekonstitution (S. 25), sind schon bei der Enzymspaltung mehrere Parameter für die anschließende Rekonstitutionsausbeute von Bedeutung. Dazu gehören vor allem: Art und Konzentration der zur Spaltung verwendeten denaturierenden Mittel, Art der vorhandenen Ionen,

Ionenstärke, p_H , Temperatur, Anwesenheit von Reduktionsmitteln und die Zeit, während der die denaturierenden Bedingungen wirksam sind.

2. Die Art der denaturierenden Mittel

Die Art der denaturierenden Mittel wird, wie oben besprochen, weitgehend durch die beabsichtigte Trennmethode festgelegt. Abgesehen von seiner Verwendbarkeit in der Cellogelelektrophorese, ist Harnstoff zur Enzymspaltung besonders gut geeignet, weil er sich - im Gegensatz zu SDS, welches sehr stark an Proteine bindet - ohne besonderen Aufwand wieder aus der Proteinlösung entfernen läßt. (Inzwischen wurde zwar bekannt, daß sich Polymerase und andere Enzyme nach Spaltung mit SDS wieder renaturieren lassen. Doch nur, nachdem das Protein zusätzlich mit Harnstoff behandelt wurde, ließ sich das Detergens wieder chromatographisch entfernen (55)). Gegenüber GuanidinHCl oder GuanidinHSCN hat Harnstoff außer dem Wegfall von Ionenstärkeeffekten, den Vorteil, daß er in einer Konzentration von 6 M zwar zur vollständigen Dissoziation des Enzyms ausreicht, aber in der erwähnten Konzentration auf die meisten bisher untersuchten Proteine bei 0° C nur partiell denaturierend wirkt (56), so daß die Polypeptidketten noch Reste der nativen Konformation enthalten können, welche eventuell für eine Rekonstitution erforderlich sind.

3. Art der bei der Denaturierung anwesenden Ionen

Wie an einer Reihe von Proteinen durch Untersuchungen anderer Autoren festgestellt wurde, hat die Art der bei der Enzymspaltung vorhandenen Ionen für das Ausmaß der Denaturierung und die zu erwartende Rekonstitutionsausbeute entscheidende Bedeutung (57, 58).

Anhand der analytischen Trennung von Polymerase-Untereinheiten auf Cellogel zeigt sich (Abb. 2), daß die Art der im Trennpuffer vorhandenen Ionen auch auf die relative Beweglichkeit der Untereinheiten und damit auf die Qualität ihrer Trennung Einfluß hat.

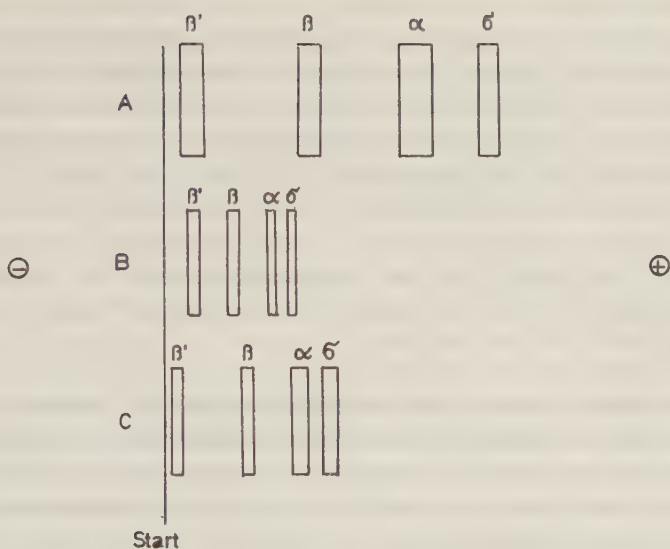


Abb. 2: Vergleich der relativen Beweglichkeiten der Untereinheiten der RNA-Polymerase in der Cellogelelektrophorese: 1,5 Std., 1000V
A Borat-Harnstoff (S. 59)
B Tris-Harnstoff
C Ammoniumbicarbonat-Harnstoff

In Vorversuchen sollte also zunächst die Zusammensetzung eines Trennpuffers ermittelt werden, der einerseits rekonstituierbare Untereinheiten liefert und andererseits eine saubere und schnelle Trennung zulässt. Borat-Harnstoff-Puffer ist zur analytischen und präparativen Trennung der Untereinheiten, was die Schnelligkeit und Reinheit der Präparation betrifft, sehr gut geeignet (Abb. 2). Experimente zur Rekonstitution der aus diesem Puffer gewonnenen Untereinheiten, verliefen jedoch erfolglos. Selbst nach Entfernung der Borat-Ionen durch Komplexbildung mit den cis-ständigen OH-Gruppen von Saccharose mit anschließender Dialyse gegen zuckerfreie Harnstofflösung ließen sich die Untereinheiten nicht mehr zu aktivem Enzym rekonstituieren. Native Polymerase wurde unter Standardtestbedingungen durch Borat in ihrer Aktivität nicht

beeinträchtigt. Der Mechanismus dieser Wirkung von Borat-Ionen ist noch nicht untersucht. Aus Versuchen an verschiedenen Enzymen und an Proteinen weiß man jedoch, daß bestimmte Salze die denaturierende Wirkung von Harnstoff verstärken (57). Möglicherweise haben Borat-Ionen auf Proteine eine ähnliche Wirkung. Die Wirkung von Borat ließe sich auch durch eine besonders feste Bindung des Anions an bipolare Gruppen des Proteins erklären, welche häufig im Inneren des Proteinmoleküls zu finden sind und nur bei der Entfaltung des Polypeptids zugänglich werden (58). Von α -Chymotrypsin ist z. B. bekannt, daß eine Rekonstitution des Enzyms durch zweiwertige Anionen verhindert wird.

Für eine schnelle und saubere elektrophoretische Trennung der Unter-einheiten sind auch noch Tris- oder Ammoniumbicarbonat-Harnstoff-Puffer geeignet (Abb. 2). Gegenüber Tris hat Ammoniumbicarbonat jedoch den Vorteil, daß sich - besonders bei größeren Proteinmengen (> 1 mg pro "analytischen" Streifen) - ϕ besser von α abtrennen läßt, ohne daß dafür mehr Zeit erforderlich wäre.

Tabelle 2: Einfluß der Zusammensetzung des Spaltungspuffers auf die Ausbeute an reaktivierter RNA-Polymerase aus E.coli

a) Spaltung in 0,5 M Trisacetat

p_H	10 % Glycerin	0,02 M Mg^{++}	% Restaktivität	% Reaktivierung
8	+	+	1,9	12,5
8	-	+	0,4	4,6
8	+	-	0,4	2,3
8	-	-	0,1	0
9	+	+	3,8	19,7
9	-	+	1,3	19,2
9	+	-	0,3	2,3
9	-	-	0,4	3,5

b) Spaltung in 0,4 M Ammoniumbicarbonat

p_H	10 % Glycerin	0,02 M Mg^{++}	% Restaktivität	% Reaktivierung
8,2	+	+	3,4	53,7
8,2	-	+	2,8	63,5
8,2	+	-	2,7	-
8,2	-	-	2,3	-
9	+	+	1,1	100
9	-	+	1,3	125
9	+	-	2,1	98,5
9	-	-	0,7	97,5

Legende zu Tabelle 2 (S. 16):

Das Enzym hatte eine spezifische Ausgangsaktivität von 125 nMol AMP-Einbau pro Min. pro 1 mg Protein an T₇-DNA. Die eingesetzte Proteinmenge betrug bei a) 70 µg, bei b) 41 µg pro Test. Getestet wurde unter Standardbedingungen. (25)

Der Spaltungspuffer enthielt außerdem 6 M Harnstoff, 0,002 M β-Mercaptoäthanol, 0,001 M EDTA. Es wurde bei 0 °C eine Stunde lang inaktiviert und anschließend gegen Reaktivierungspuffer über Nacht bei 0 °C dialysiert. Vor dem Test wurde 2 Stunden bei 20 °C inkubiert.

Vergleicht man anhand von Tab. 2 die Rekonstitutionsausbeuten nach Spaltung der Polymerase in Tris- mit denen nach Spaltung in Bicarbonat-Harnstoff-Puffer, so läßt sich - abgesehen von den Einflüssen durch p_H, Magnesium-Ionen und Glycerin, auf die noch eingegangen wird - bis zu 100 % Reaktivierung bei Verwendung von Bicarbonat gegenüber nur 20 % Reaktivierung nach Spaltung in Tris feststellen. Obwohl sich für diesen Befund noch keine Erklärung anbietet, stimmt diese Beobachtung mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, wonach die Art der puffernden Ionen im Spaltungspuffer die Rekonstitutionsausbeute beeinflußt (57). Auch die Wirkung von Magnesium-Ionen und Glycerin im Spaltungspuffer auf die Reaktivierung ist nach Tab. 2 davon abhängig, ob in Tris oder Bicarbonat gespalten wurde. Es läßt sich auch eine deutliche p_H-Abhängigkeit feststellen. Wenn in Tris gespalten wird, muß auch bei p_H 9 Mg⁺⁺ anwesend sein, während eine Dissoziation des Enzyms in Ammoniumbicarbonat nur bei p_H 8,2 die Anwesenheit von Mg⁺⁺ für eine ausreichende Reaktivierung erfordert. Dagegen spielen bei einer Spaltung des Enzyms in Ammoniumbicarbonat bei p_H 9 Mg⁺⁺ oder Glycerin keine Rolle. In jedem Fall beträgt dann die Ausbeute der Reaktivierung ca. 100 %.

Möglicherweise werden die Enzym-Untereinheiten durch die Anwesenheit von Mg⁺⁺ und Glycerin gegen die denaturierende Wirkung des Harnstoffs geschützt, wie auch die in diesen Fällen vorhandene Restaktivität von 1,1 - 3,8 % andeutet. Über eine ähnliche Beobachtung bezüglich der Wirkung von Glycerin berichtet auch Sethi (44). Diese Schutzwirkung tritt dann nicht mehr in Erscheinung, wenn durch die Wahl eines geeigneten p_H- und Ionenmilieus bei der Spaltung die Untereinheiten weniger stark zum irreversiblen Ausfallen neigen, bzw. ihre Löslich-

keit bei der Entfernung des Harnstoffs beibehalten, so daß dann eine 100 %ige Ausbeute an reaktiviertem Enzym von der Anwesenheit der Magnesium-Ionen und des Glycerins unabhängig ist.

4. Einfluß des p_H bei der Enzymspaltung

Eine weitere Untersuchung der p_H -Wirkung bei der Spaltung des Enzyms zeigt, daß diese auch vom p_H des Reaktivierungspuffers abhängig ist.

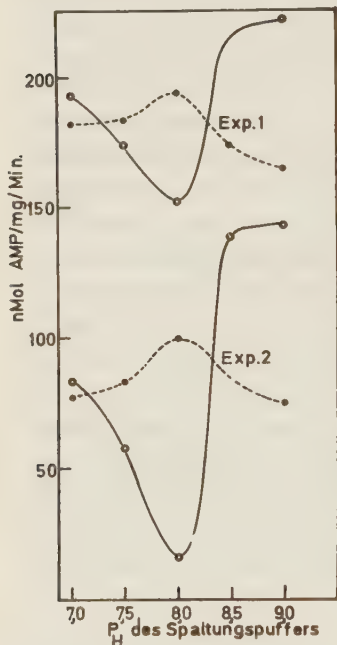


Abb. 3: Abhängigkeit der Ausbeute an reaktivierter RNA-Polymerase vom p_H des Spaltungspuffers und dem p_H des Reaktivierungspuffers. Spaltung von Vollenzym in 6 M Harnstoff, 0,3 M Ammoniumbicarbonat, 0,01 M Magnesiumacetat, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 0,001 M EDTA, 5 % (V/V) Glycerin. 3 Std. bei 0° C inaktiviert. Reaktivierung: ●---● bei p_H 7,5, ○—○ bei p_H 7,9 durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer (S. 59) bei 0° C über Nacht und anschließender Inkubation bei 20° C, 4 Std. Proteinkonzentration nach Reaktivierung: Experiment 1: 1,1 mg/ml Experiment 2: 0,3 mg/ml Aktivität des unbehandelten Enzyms an T_5 -DNA: Exp. 1: 100 nMol AMP-Einbau/mg/Min. Exp. 2: 42 nMol AMP-Einbau/mg/Min.

In Abb. 3 lassen sich je nach dem p_H des Reaktivierungspuffers verschiedene p_H -Optima für den Spaltungspuffer ablesen. Für den in den folgenden Experimenten verwendeten und von Lill und Hartmann beschriebenen p_H des Reaktivierungspuffers von 7,9 (bzw. 8) ergibt sich für den p_H des Spaltungspuffers ein Optimum von 8,5 - 9. Der p_H -Effekt auf die Rekonstituierbarkeit des Enzyms läßt sich zum Teil dadurch erklären, daß bei ausreichender Entfernung vom isoelektrischen

Punkt des Proteins unter denaturierenden Bedingungen die freiliegenden Aminosäure-Seitenketten gleichsinnig negativ geladen sind, wodurch unspezifische Aggregation und irreversibles Ausfallen von unloslichen Komplexen verhindert werden. Außerdem besteht für viele Proteine eine unmittelbare Abhängigkeit der denaturierenden Wirksamkeit des Harnstoffs vom p_H (56), welche jedoch für die Polymerase nicht untersucht wurde.

Der zur Enzymspaltung verwendete p_H von 9 begünstigt nicht nur die Rekonstitutionsausbeute, sondern auch die elektrophoretische Trennung. Bei diesem p_H sind die Untereinheiten überwiegend negativ geladen und unterscheiden sich deutlich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit. Da die Banden bei p_H 9 relativ schnell wandern, wird auch beim Auftragen größerer Proteinmengen die Laufzeit nicht wesentlich verlängert. Liegt der p_H -Wert wesentlich höher als 9 (> 10), ändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit von B', was dazu führt, daß B' auf Cellogel wie B wandert und daher die beiden Untereinheiten nicht mehr getrennt werden (28).

Zu beachten ist bei alkalischem p_H , daß es unter den denaturierenden Bedingungen zu Folgereaktionen des partiell entfalteten Proteins kommen kann, welche eine irreversible Denaturierung bewirken könnten.

- a) Im Alkalischen, und besonders in Anwesenheit von Metallionen, wird die Reaktionsbereitschaft von SH-Gruppen erhöht. Da durch die Denaturierung die Zahl der titrierbaren SH-Gruppen ansteigt (56), kann es besonders leicht zur Ausbildung von inter- und intramolekularen S-S-Brücken kommen, die eine Renaturierung verhindern würden. Dieser unerwünschte Effekt läßt sich durch Zusatz von Reduktionsmitteln ausschalten. Häufig wird DTT verwendet. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde β -Mercaptoäthanol bevorzugt, weil es - trotz geringerer reduzierender Wirksamkeit - den Vorteil hat, daß es stabiler ist und daher die Wirkung länger anhält.
- b) In konzentrierten alkalischen Harnstofflösungen wandelt sich ein Bruchteil des Harnstoffs in Cyanat und Ammoniak um (59). Das so entstandene Cyanat kann mit den Aminogruppen des Proteins weiter-

reagieren und ebenfalls zu einer irreversiblen Proteindenaturierung führen. Da jedoch die Bildung von Cyanat nur bei Temperaturen ab 20° C ins Gewicht fällt (59) und außerdem durch den - bei Verwendung von NH_4HCO_3 -Puffer - im Überschuß vorhandenen Ammoniak verhindert wird, ist nicht zu erwarten, daß aufgrund der Inaktivierung des Proteins durch Cyanat wesentliche Verluste entstehen.

5. Einfluß der Ionenstärke bei der Enzymspaltung

Für das Verhalten von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen ist nicht nur die Art der vorhandenen Ionen, sondern auch die Ionenstärke von Bedeutung (56, 58). Durch hohe Ionenstärke wird die Aggregatbildung verhindert und außerdem die Konformation der aufgefalteten Polypeptidketten beeinflußt (56). So werden z. B. hydrophobe Aminosäure-Seitenketten verstärkt vom Kontakt mit dem umgebenden wäßrigen Medium ausgeschlossen, was zu einer Stabilisierung hydrophober Bindungen beiträgt. Durch den Einsatz der Cellogelelektrophorese kann jedoch die Ionenstärke nur innerhalb bestimmter Grenzen variiert werden. Sie darf nicht zu hoch sein, damit die zulässige Stromwärme nicht zu einer entsprechend verminderten Spannung führt, wodurch eine längere Laufzeit erforderlich wäre. Maximal sind pro Cellogelstreifen 25 Watt möglich. Andererseits darf die Ionenstärke auch nicht zu niedrig sein, damit die Pufferkapazität ausreicht, und damit es nicht durch in der Proteinlösung enthaltene Salze zu unscharfen und unregelmäßigen Banden kommt. Das ist der Fall, wenn der Spannungsabfall im Bereich der Proteinbanden kleiner oder gleich dem in ihrer Umgebung ist.

6. Stabilität der Untereinheiten

Während Polymerase in harnstofffreiem Puffer bei niedrigerer Temperatur relativ lange stabil ist, kommt es in Harnstofflösung nicht nur zu einer Inaktivierung und zur Dissoziation in Untereinheiten, sondern die Untereinheiten verlieren bei derselben Temperatur unter Einwirkung des denaturierenden Agens, in Abhängigkeit von der Zeit, immer mehr die Fähigkeit zur Rekonstitution.

Tabelle 3: Gemischte Rekonstitution von RNA-Polymerase aus frisch präparierten Untereinheiten und Untereinheiten, die 24 Std. in harnstoffhaltigem Puffer aufbewahrt wurden

alte Untereinheiten			neue Untereinheiten			σ	nmol AMP/Min./mg
α	B	B'	α	B	B'		
+	+	+	-	-	-	+	1,6
-	-	-	+	+	+	+	27,2
+	-	-	-	+	+	+	30,4
-	+	-	+	-	+	+	10
-	-	+	+	+	-	+	2,1
+	+	-	-	-	+	+	6
+	-	+	-	+	-	+	-
-	+	+	+	-	-	+	0

Nach elektrophoretischer Trennung in 0,5 M NH_4HCO_3 , 6 M Harnstoff, 0,01 M Mg^{++} , 5 % Glycerin, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, pH 9,0, 5 Std. Laufzeit wurden die Untereinheiten frisch präpariert und wie im Schema angegeben mit 24 Std. alten Untereinheiten, die in derselben Weise hergestellt und in 6 M Harnstoff bei 0° C aufbewahrt wurden, gemischt rekonstituiert. Der Testansatz enthielt 6 μg Protein, getestet wurde unter Standardbedingungen mit T_7 -DNA. Alle Proben enthielten σ in stöchiometrischer Menge. Auch die übrigen Untereinheiten waren in stöchiometrischen Verhältnissen gemischt.

Durch gemischte Rekonstitution von Untereinheiten, die sich 24 Std. lang bei 0° C in Harnstoff-Puffer befanden, mit frisch präparierten lies sich feststellen, daß B' besonders empfindlich und nach dieser Zeit nicht mehr verwendbar ist. Auch B ist dann nur noch zu einem Drittel aktiv, während α unveränderte Aktivität besitzt (Tab. 3).

Wie Abb. 4 zeigt, unterscheidet sich σ , welches durch Cellogelelektrophorese in Harnstoff isoliert wurde, kaum in seiner Fähigkeit, Basalenzym zu stimulieren, von σ , das ohne Einwirkung denaturierender Agentien durch Chromatographie auf Phosphoryl-Cellulose von Holoenzym abgetrennt wurde. Dabei spielt es keine Rolle, ob σ auf der Cellogelelektrophorese in Bicarbonat- oder Boratpuffer isoliert wurde, und wie lange es der Wirkung von Harnstoff ausgesetzt war.

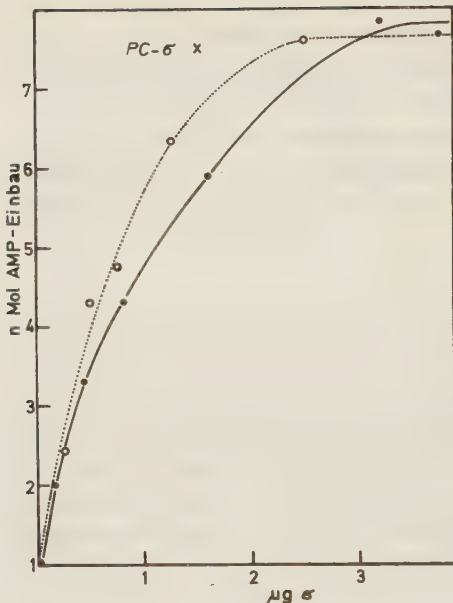


Abb. 4: Stimulierung von Basalenzym durch 6, welches in der Cellogelelektrophorese isoliert wurde (S. 62).

● —●—● Isolierung in Ammoniumbicarbonat-Harnstoff
○ ·····○ Isolierung in Borat-Harnstoff auf präparativen Cellogelblöcken über Nacht.

Test unter Standardbedingungen an T₅-DNA. Pro Testansatz wurden 4⁵ µg Basalenzym eingesetzt.

Diese zunehmende Inaktivierung der Untereinheiten mit hohem Molekulargewicht ist nicht nur zeit- sondern auch temperaturabhängig; denn wenn man frisch präparierte Untereinheiten sofort, bei -20° C oder -70° C einfriert, lassen sie sich noch nach einer Woche mit guter Ausbeute zu aktivem Enzym rekonstituieren. Es ist bemerkenswert, daß von diesem zunehmenden Aktivitätsverlust in Gegenwart von Harnstoff selbst bei 0° C, besonders die im Vergleich zu α und 6 langen Polypeptidketten B und B' betroffen sind.

Man könnte sich daher vorstellen, daß die Wahrscheinlichkeit der Rückkehr zur nativen Konformation umso geringer ist, je länger das Proteinmolekül nach seiner Entfaltung ist und je mehr Möglichkeiten es damit zur Annahme einer Konformation erhält, die zu einem enzymatisch inaktiven Produkt führt. Die fortschreitende Inaktivierung von B und B' rechtfertigt die Annahme, daß nach Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten durch 6 M Harnstoff, diese nur partiell denaturiert sind und noch Reste der nativen Struktur enthalten, wodurch die Rekonstitution erleichtert (z. B. beschleunigt) oder überhaupt

erst möglich wird. Die Wirkung eines denaturierenden Agens wie z. B. Harnstoff beruht nämlich auf einer Verminderung der Stabilität schwacher chemischer Bindungen zwischen den Amino- und Carbonyl-Gruppen der Peptidbindungen (Wasserstoffbrücken) oder zwischen Aminosäure-Seitenketten (Wasserstoffbrücken- bzw. hydrophobe Bindung), durch die in physiologischem Milieu die native Konformation des Proteins als der Zustand der geringsten freien Energie stabilisiert wird. Diese Bindungen sind kooperativ, d. h. sie verleihen dem Protein nur deshalb seine Stabilität, weil sie in großer Zahl vorhanden sind. Ändert man nun die Umgebung des Proteins z. B. durch Zusatz von Harnstoff, werden die zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigten Gruppen durch Harnstoff kompetitiv besetzt. Außerdem ändert sich die regelmäßige Anordnung der das Protein umhüllenden Wassermoleküle und deren Wechselwirkung mit dem Protein. Dadurch können die bevorzugt im Inneren des Proteinmoleküls angeordneten hydrophoben Aminosäure-Seitenketten mit dem umgebenden Lösungsmittel in besseren Kontakt kommen. Auf diese Weise erhöht sich die Beweglichkeit der im nativen Zustand in innerer Lage zueinander fixierten Seitenketten, das Protein kann sich entfalten, ohne daß dabei die Aminosäuresequenz verändert wird.

Die denaturierenden Bedingungen bewirken also eine Zunahme der Entropie des Systems. Der Zustand des denaturierten Proteins ist thermodynamisch stabil, weil er unter Verlust an freier Energie erreicht wird. Denaturierung ist also als Übergang zu verstehen vom thermodynamisch stabilen Zustand der nativen Konformation in physiologischem Milieu zum thermodynamisch stabilen Zustand der völlig entfalteten Polypeptidkette (random coil) unter der Einwirkung des denaturierenden Agens, welches eine freie Beweglichkeit der Aminosäure-Seitenketten bewirkt. Dieser Vorgang ist ebenso wie die Aufrechterhaltung und Gewinnung der nativen Konformation kooperativ, d. h. nicht alle Aminosäurereste können gleichzeitig frei beweglich werden, sondern die Lösung der schwachen chemischen Bindungen einzelner Reste ist Voraussetzung für die Lösung weiterer Bindungen. So läßt sich erklären, daß die Harnstoffkonzentration, die zu einer Spaltung des Enzyms in seine Untereinheiten ausreicht, noch nicht zu einer völligen Denaturierung der Unter-

einheiten führt, sondern daß die Untereinheiten noch Reste der nativen Struktur enthalten. Solche partiell denaturierten Proteine lassen sich, wie experimentelle Befunde (56) zeigen, durch Erhöhung der Harnstoffkonzentration oder durch Zusatz eines stärkeren denaturierenden Agens wie GuanidinHCl weiter denaturieren bis der "random coil" Zustand erreicht ist.

Offenbar schreitet aber die Denaturierung auch bei intermediären Harnstoffkonzentrationen (6 M) weiter fort wie die zunehmende Inaktivierung von B und B' beweist. Daraus läßt sich folgern, daß sich diese partiell denaturierten Untereinheiten in einem metastabilen Zustand befinden. Mit anderen Worten, sie haben den thermodynamisch stabilsten Zustand noch nicht erreicht, obwohl die Denaturierungsreaktion spontan ablaufen kann. Wahrscheinlich sind die Geschwindigkeiten, mit denen sich die verschiedenen Regionen dieser langen Polypeptide entfalten, sehr unterschiedlich. Eine Erklärung dieser zunehmenden Inaktivierung von B und B' durch die oben beschriebenen Folgereaktionen mit Cyanat und Ausbildung von Disulfidbrücken scheint aus den erwähnten Gründen unwahrscheinlich, besonders da α und β die gleichen Bedingungen ohne Aktivitätsverlust überstehen.

Kapitel II: Die Rekonstitution der RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten

Durch Denaturierungs- und Rekonstitutionsexperimente wie sie seit der Reaktivierung von RNase (50) an einer Reihe anderer, auch komplizierter gebauter Enzyme (49, 52) erfolgreich durchgeführt wurden, läßt sich die für die biologische Aktivität erforderliche dreidimensionale Struktur unter definierten Bedingungen in vitro wiederherstellen.

Aufgrund dieser Untersuchungen gilt als gesichert, daß zur Gewinnung und Aufrechterhaltung der nativen Konformation eines Proteins in physiologischem Milieu ausschließlich die in der Aminosäuresequenz enthaltene Information maßgeblich ist (50, 51, 54). Besteht ein Enzym aus mehreren Untereinheiten, so läßt sich deren Anordnung ebenfalls auf die Primärstruktur der am Enzymaufbau beteiligten Polypeptidketten zurückführen (60). D. h. die für die biologische Aktivität erforderliche native Struktur wie sie unter physiologischen Bedingungen vorhanden ist oder wie sie nach Entfernung eines denaturierenden Agens wiedergewonnen werden kann, stellt den für die betreffende Aminosäuresequenz charakteristischen thermodynamisch stabilsten Zustand dar.

Dieser Feststellung scheinen jedoch experimentelle Befunde zu widersprechen. Denn verschiedene Enzyme lassen sich trotz gleicher Behandlung nur mit sehr unterschiedlichen Ausbeuten reaktivieren (52). Erst wenn man Experimente betrachtet, die zeigen, daß die Bedingungen, unter denen eine Denaturierung reversibel ist, nicht für jedes Protein gleich sind (52), klärt sich dieser Widerspruch auf. Die für eine Reaktivierung optimalen Bedingungen unterscheiden sich nämlich je nach Protein sowohl qualitativ (reduzierendes Milieu, Metallionen, Substrat, Co-Enzyme) als auch quantitativ (Ionenstärke, Proteinkonzentration, Temperatur, p_H) beträchtlich (51, 52). Zur Überwindung der thermodynamischen und kinetischen Hindernisse, die einer Rekonstitution entgegenstehen, müssen die geeigneten Rekonstitutionsbedingungen für jedes Protein neu bestimmt werden.

Für die Polymerase ist von Lill und Hartmann eine Methode entwickelt worden, welche zu einer 50 %igen Reaktivierung des Enzyms nach Denaturierung in 6,5 M Harnstoff führt (48). Obwohl sich allein durch die Wahl eines geeigneten Spaltungspuffers die Ausbeute auf 100 % erhöhen ließ, sind bei der Rekonstitution von Polymerase aus isolierten Untereinheiten noch zusätzliche Einflüsse zu beachten, welche die Rekonstitutionsausbeute und die Reproduzierbarkeit vermindern können. Eine hohe Ausbeute und gute Reproduzierbarkeit sind aber eine wichtige Voraussetzung, damit sich die Effekte beim Austausch modifizierter Untereinheiten gegen solche aus Normalenzym von dem Aktivitätsverlust unterscheiden lassen, welcher allein durch die Methode der Rekonstitution bedingt ist.

1. Essentielle Faktoren bei der Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten

Zur Aufhebung der denaturierenden Bedingungen lassen sich bei Harnstoff zwei Methoden anwenden:

- a) Verdünnung der harnstoffhaltigen Proteinlösung mit Rekonstitutionspuffer auf das 100-fache.
- b) Dialyse gegen harnstofffreien Puffer.

Für die Polymerase läßt sich die Methode der Rekonstitution durch Verdünnung nicht anwenden (55), auch bei anderen bisher untersuchten Enzymen (52) werden durch Dialyse wesentlich bessere Rekonstitutionsausbeuten erreicht als durch Verdünnung. Entsprechend den Versuchen von Sethi, wo nach Spaltung der Polymerase in 3 - 4,5 M LiCl und anschließender Dialyse der Fraktionen α und β sich diese durch Vereinigen im Test zu aktivem Enzym zusammensetzen ließen (43, 44), wurde zunächst versucht, die einzelnen in 6 M Harnstoff befindlichen Untereinheiten isoliert zu renaturieren, um sie dann wieder zu aktiver Polymerase zu vereinigen.

Wie Tabelle 4 zeigt, wird die spezifische Aktivität des Ausgangsenzyms zu 20 - 100 % wieder erreicht. Untereinheiten, die einzeln dialysiert und nach der Dialyse vereinigt wurden, sind nur viermal so aktiv wie die Summe der Restaktivitäten der isoliert dialysierten Untereinheiten, während nach Kodialyse die 20 - 40fache spezifische

Aktivität erreicht wurde. Die Restaktivität der einzeln dialysierten Untereinheiten beruht wahrscheinlich auf Verunreinigungen mit den fehlenden Untereinheiten infolge unvollständiger Trennung.

Tabelle 4: Rekonstitution von DNA-abhängiger RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten

Minimal-Enzym oder äquivalente Menge der Untereinheit	mU./mg
<u>Experiment 1:</u>	
Ausgangsenzym	124
Untereinheit im Rekonstitutionsansatz dialysiert	
α_s + σ	1,6
β_s + σ	3,2
β'_s + σ	1,7
α_s + β_s + β'_s + σ	127 (100 % Rekonstitution)
α_s + β_s + β'_s - σ	7,0
Untereinheiten nach Dialyse vereinigt	
α_s + β_s + β'_s + σ	25,6
<u>Experiment 2:</u>	
Ausgangsenzym	242
Untereinheit im Rekonstitutionsansatz dialysiert	
α + σ	1,9
β + σ	1,4
β' + σ	2,9
α + β + β' + σ	74 (31 % Rekonstitution)

Trennung der Untereinheiten bei p_H 8 in der Cellogelelektrophorese in 0,5 M Tris, 6 M Harnstoff, 0,04 M Magnesiumacetat, 0,02 M Mercaptoethanol, 0,001 M EDTA, 20 % (V/V) Glycerin. Mischung der Untereinheiten entweder vor oder nach der Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer in stöchiometrischen Verhältnissen. Es wurde über Nacht bei 0°C dialysiert und vor dem Test 30 - 60 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Test an T₇-DNA unter Standardtestbedingungen, je 50 µl der Rekonstitutionslösung. Die Proteinkonzentration betrug bei Experiment 1 0,14 mg/ml, bei Experiment 2 0,22 mg/ml. Untereinheiten mit dem Index "s" stammen aus Streptolydigin-resistentem Enzym.

Auch wenn man jeweils zwei Untereinheiten zusammen gegen harnstofffreien Puffer dialysiert und die fehlende, für sich dialysierte Untereinheit vor dem Test dazugibt, erhält man keine Rekonstitution. Dieses Ergebnis widerspricht den Resultaten von Sethi (43, 44). Möglicherweise werden durch hohe LiCl-Konzentrationen andere Regionen der Untereinheiten denaturiert als in Harnstoff. LiCl kann nämlich im Gegensatz zu Harnstoff nicht zur Spaltung hydrophober Bindungen beitragen, so daß der Anteil nativer Regionen in den getrennten Untereinheiten ausreichend sein könnte, um bei Entfernung des LiCl ein Ausfallen zu verhindern. Demgegenüber läßt sich häufig beobachten, daß Harnstoff-denaturierte Proteine bei Entfernung des Harnstoffs präzipitieren (60). Es werden also wahrscheinlich durch die Denaturierung in Harnstoff zusätzliche unspezifische Bindungsstellen an den Polypeptidketten freigelegt, so daß sich beim Entfernen des Harnstoffs leicht unlösliche Aggregate bilden können. Der Prozeß des Zusammentretens (assembly) von Untereinheiten zum aktiven Enzym *in vitro* ist noch nicht untersucht. Auch bei anderen Enzymen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen (51), ist noch nicht bekannt, ob die einzelnen Polypeptidketten zuerst renaturiert sein müssen, damit sie sich zu biologisch aktivem Enzym vereinigen können oder ob sie sich erst renaturieren können, nachdem sie in ihrer Lage zueinander durch spezifische (60) Bindungsstellen fixiert sind. Wahrscheinlich müssen die Untereinheiten, bevor sie sich überhaupt sinnvoll zu einem löslichen Zwischenprodukt zusammenlagern können, schon partiell renaturiert sein (52). Die Spezifität der Bindung von Untereinheiten untereinander erfordert eine ausreichend native Struktur. Erst nach der Bildung des richtigen Zwischenkomplexes kann die Rekonstitution in Richtung auf die endgültige, biologisch aktive Konformation weiterlaufen.

Aus der Tatsache, daß die Rekonstitution der Polymerase aus isolierten Untereinheiten die gleichzeitige Anwesenheit aller Untereinheiten erfordert, kann man auf einen kooperativen Prozeß beim Zusammentreten zu funktionsfähigem Enzym schließen. Eine ähnliche Erscheinung ist bei der Rekonstitution von 30 S Ribosomen beschrieben (61). Auch in diesem Fall ist eine Anzahl essentieller Bausteine für die Bildung eines Zwischenprodukts bekannt, welches Voraussetzung für die endgültige Rekonstitution ist.

2. Faktoren, die die Rekonstitution stimulieren

a) Strukturbestandteile des Enzyms

Für manche Enzyme sind außer den bei der Rekonstitution essentiellen Untereinheiten auch noch Faktoren bekannt, die auf die Reaktivierung stimulierend wirken können. Sie sind zwar als Strukturbestandteile des biologisch aktiven Komplexes erforderlich, jedoch nicht unbedingt für den eigentlichen Prozeß der Rekonstitution. Als solcher Faktor ist z. B. das Coenzym DPN (52) anzusehen, welches auf die Rekonstitution von Lactatdehydrogenase (LDH), Malatdehydrogenase (MDH) und Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GPD) stimulierend wirkt. Für die Polymerase kommt als solcher Faktor σ in Frage, denn es wird relativ fest an das Enzym gebunden und ist für die biologische Aktivität erforderlich. Nach Tabelle 4, Experiment 1, ist σ ebenfalls essentiell für die Rekonstitution. Das ist jedoch nur der Fall, wenn man das Enzym bei p_H 8 spaltet. Ein Hinweis, daß sich auch ohne σ Polymerase reaktivieren läßt, ergab sich aus einem Vorversuch, durch welchen untersucht werden sollte, ob Basalenzym wie Vollenzym nach Inaktivierung in 6 M Harnstoff bei p_H 9 wieder reaktivierbar ist.

Tabelle 5: Reaktivierung von Basalenzym nach Spaltung bei p_H 9

10 % Glycerin	0,02 M Mg^{++}	% Reaktivierung
+	+	40
-	+	21,5
+	-	32
-	-	29

Die Inaktivierung von Minimalenzym erfolgte in 0,4 M NH_4HCO_3 , 6 M Harnstoff, 0,02 M Mercaptoäthanol, 0,001 M EDTA bei p_H 9. Die Zeit der Inaktivierung betrug 7 Std. bei 0° C. Die Reaktivierung wurde wie bei Tabelle 1 durchgeführt. Getestet wurde unter Standardbedingungen an T₇-DNA. Die Proteinkonzentration betrug 6,2 mg/ml. Im Aktivitätstest wurden jeweils 31 μ g eingesetzt. Das unbehandelte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 130 nMol AMP-Einbau/mg/Min. Der Test enthielt die stöchiometrische Menge σ .

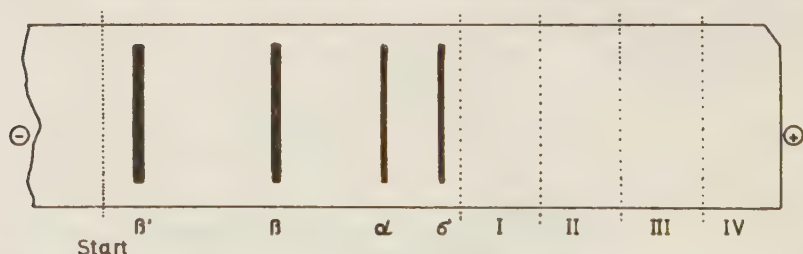
Tabelle 5 zeigt, daß trotz des Fehlens von σ bei der Dialyse die spezifische Aktivität des unter optimalen Bedingungen reaktivierten

phorese ein niedermolekularer Enzymbestandteil abgetrennt wird, der für eine 100 %ige Rekonstitution erforderlich ist. Ein solches Molekül würde sehr leicht dem Nachweis durch Amidoschwarzfärbung entgehen, wenn es stark sauer ist und außerdem ein geringes Molekulargewicht hat. Ein niedermolekularer Enzymbestandteil ließe sich eventuell durch seine Fähigkeit, die Rekonstitution zu stimulieren, nachweisen. Zu diesem Zweck wurde nicht nur das Protein aus den stark mit Amidoschwarz anfärbbaren Banden isoliert, sondern der Abschnitt des Cellogelelektrophoresestreifens zwischen der σ -Bande und der Anode vierfach unterteilt (Abb. 6) und die in den einzelnen Abschnitten enthaltene Lösung ebenfalls isoliert. Diese vier Fraktionen wurden dem Rekonstitutionsansatz vor der Dialyse zugesetzt.

Tabelle 6:

Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz	Fraktion	nMol AMP/mg/Min.	Proteinkonzentration nach Dialyse mg/ml
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma$	-	42,5	0,5
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma +$	I	45,5	0,38
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma +$	II	35	0,65
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma +$	III	72	0,33
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma +$	IV	41	0,6

Abb. 6: Gewinnung der Fraktionen I-IV aus dem Cellogelelektrophoresestreifen.



Nach Tabelle 6 könnte die mit III bezeichnete Fraktion einen solchen stimulierenden Faktor enthalten, denn die Rekonstitutionsausbeute ließ sich in diesem Experiment von 42 nMol AMP-Einbau der Kontrolle auf 72 nMol steigern. Diese Stimulation der Rekonstitution konnte jedoch nur noch einmal mit geringerer Ausbeute und zweimal überhaupt nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich um einen

ganz anderen Effekt, auf den noch eingegangen werden muß (S.41). Die Proteinkonzentration war nämlich in der Probe, die den besten Einbau zeigte, am geringsten und zwar in einer Größenordnung, die, wie sich bei späteren Experimenten herausstellte, für die Rekonstitution optimal ist. Wahrscheinlich handelt es sich also nicht um die Wirkung eines niedermolekularen Enzymbestandteils.

Kurz vor Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurde durch Goldthwait die Existenz eines weiteren niedermolekularen Enzymbestandteils nachgewiesen (63). Es handelt sich dabei um Zink, welches im Verhältnis 2 Grammatom $Z_n/1$ Mol Polymerase-Monomer im Enzym vorhanden ist.

Bei den bisher durchgeführten Versuchen zur Rekonstitution mußte jedoch - falls es sich überhaupt auf der Cellogelelektrophorese von den Untereinheiten abtrennen läßt - das Vorhandensein und die Funktion von Zink als Enzymbestandteil verborgen bleiben, weil allein das im Spaltungs- und Rekonstitutionspuffer in einer Konzentration von 10^{-2} M verwendete Magnesiumacetat Zink als Spurenelement in einer Menge enthält, welche bei dem geringen Bedarf selbst bei einer EDTA-Konzentration von 10^{-3} M für eine Rekonstitution voll ausreichen würde. Das in der Polymerase vorhandene Zink scheint nicht nur Strukturbestandteil zu sein, sondern ist offenbar für die Initiation von Bedeutung (63). Vielleicht dient die Anwesenheit von Zink der Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation, die zur Ausübung der Enzymfunktion unbedingt erforderlich ist, ähnlich wie es z. B. bei der Alkoholdehydrogenase aus Hefe festgestellt wurde (64). In diesem Fall bewirken chelatbildende Agentien wie z. B. 1,10 Phenanthrolin bei niederen Konzentrationen eine Hemmung des Enzyms. Ist aber das Agens im Überschuß vorhanden zerfällt das Protein in Untereinheiten, welche kein Zink mehr enthalten.

b) Wirkung von Substrat und DNA auf die Rekonstitution

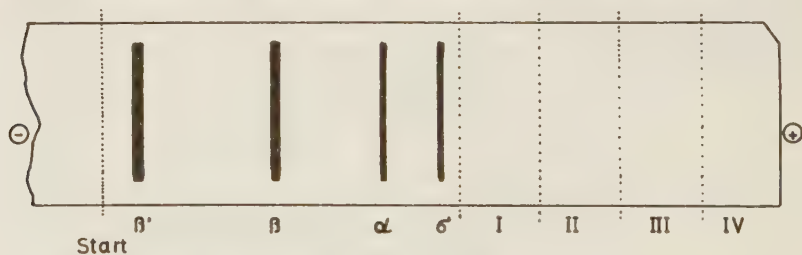
Wenn ϕ durch seine Fähigkeit, an bestimmte Regionen des partiell denaturierten Enzyms zu binden, die Rekonstitutionsausbeute steigern kann, sollte man erwarten, daß auch Moleküle, die zwar nicht Enzymbestandteil sind, aber als Substrat bzw. als Matritze an die Poly-

phorese ein niedermolekularer Enzymbestandteil abgetrennt wird, der für eine 100 %ige Rekonstitution erforderlich ist. Ein solches Molekül würde sehr leicht dem Nachweis durch Amidoschwarzfärbung entgehen, wenn es stark sauer ist und außerdem ein geringes Molekulargewicht hat. Ein niedermolekularer Enzymbestandteil ließe sich eventuell durch seine Fähigkeit, die Rekonstitution zu stimulieren, nachweisen. Zu diesem Zweck wurde nicht nur das Protein aus den stark mit Amidoschwarz anfärbbaren Banden isoliert, sondern der Abschnitt des Cellogelelstreifens zwischen der β -Bande und der Anode vierfach unterteilt (Abb. 6) und die in den einzelnen Abschnitten enthaltene Lösung ebenfalls isoliert. Diese vier Fraktionen wurden dem Rekonstitutionsansatz vor der Dialyse zugesetzt.

Tabelle 6:

Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz	Fraktion	nMol AMP/mg/Min.	Proteinkonzentration nach Dialyse mg/ml
$\alpha + \beta + \beta' + \beta''$	-	42,5	0,5
$\alpha + \beta + \beta' + \beta'' +$	I	45,5	0,38
$\alpha + \beta + \beta' + \beta'' +$	II	35	0,65
$\alpha + \beta + \beta' + \beta'' +$	III	72	0,33
$\alpha + \beta + \beta' + \beta'' +$	IV	41	0,6

Abb. 6: Gewinnung der Fraktionen I-IV aus dem Cellogelelstreifen.



Nach Tabelle 6 könnte die mit III bezeichnete Fraktion einen solchen stimulierenden Faktor enthalten, denn die Rekonstitutionsausbeute ließ sich in diesem Experiment von 42 nMol AMP-Einbau der Kontrolle auf 72 nMol steigern. Diese Stimulation der Rekonstitution konnte jedoch nur noch einmal mit geringerer Ausbeute und zweimal überhaupt nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich um einen

ganz anderen Effekt, auf den noch eingegangen werden muß (S.41). Die Proteinkonzentration war nämlich in der Probe, die den besten Einbau zeigte, am geringsten und zwar in einer Größenordnung, die, wie sich bei späteren Experimenten herausstellte, für die Rekonstitution optimal ist. Wahrscheinlich handelt es sich also nicht um die Wirkung eines niedermolekularen Enzymbestandteils.

Kurz vor Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurde durch Goldthwait die Existenz eines weiteren niedermolekularen Enzymbestandteils nachgewiesen (63). Es handelt sich dabei um Zink, welches im Verhältnis 2 Grammatom $Z_n/1$ Mol Polymerase-Monomer im Enzym vorhanden ist.

Bei den bisher durchgeführten Versuchen zur Rekonstitution mußte jedoch - falls es sich überhaupt auf der Cellogelelektrophorese von den Untereinheiten abtrennen läßt - das Vorhandensein und die Funktion von Zink als Enzymbestandteil verborgen bleiben, weil allein das im Spaltungs- und Rekonstitutionspuffer in einer Konzentration von 10^{-2} M verwendete Magnesiumacetat Zink als Spurenelement in einer Menge enthält, welche bei dem geringen Bedarf selbst bei einer EDTA-Konzentration von 10^{-3} M für eine Rekonstitution voll ausreichen würde. Das in der Polymerase vorhandene Zink scheint nicht nur Strukturbestandteil zu sein, sondern ist offenbar für die Initiation von Bedeutung (63). Vielleicht dient die Anwesenheit von Zink der Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation, die zur Ausübung der Enzymfunktion unbedingt erforderlich ist, ähnlich wie es z. B. bei der Alkoholdehydrogenase aus Hefe festgestellt wurde (64). In diesem Fall bewirken chelatbildende Agentien wie z. B. 1,10 Phenanthrolin bei niederen Konzentrationen eine Hemmung des Enzyms. Ist aber das Agens im Überschuß vorhanden zerfällt das Protein in Untereinheiten, welche kein Zink mehr enthalten.

b) Wirkung von Substrat und DNA auf die Rekonstitution

Wenn ϕ durch seine Fähigkeit, an bestimmte Regionen des partiell denaturierten Enzyms zu binden, die Rekonstitutionsausbeute steigern kann, sollte man erwarten, daß auch Moleküle, die zwar nicht Enzymbestandteil sind, aber als Substrat bzw. als Matritze an die Poly-

merase binden können, ähnlich wie G die Rekonstitution stimulieren. Eine solche Erwartung ist berechtigt, weil an den von Teipel und Koshland untersuchten Enzymen (52) durch Zusatz von Substrat oder Coenzym zum Rekonstitutionsansatz die Ausbeute an Enzymaktivität, bezogen auf die Ausbeute in Abwesenheit von Metaboliten oder Coenzymen, gesteigert werden konnte. Wie in Abb. 8a(S.36) zur Kinetik der Rekonstitution dargestellt ist, werden weder die Rekonstitutionsgeschwindigkeit noch die Ausbeute an wiedergewonnener Enzymaktivität durch ATP gesteigert. Es scheint vielmehr eine leichte Hemmung der Rekonstitution zu bewirken.

Nach Lill und Hartmann (48) soll DNA, die dem Reaktivierungsansatz nach der Dialyse während der anschließenden Inkubation bei 20°C zugesetzt wurde, auf die Reaktivierung des Enzyms stimulierend wirken. Doch aus Abb. 8 (S.36) ist ersichtlich, daß eine Inkubation des noch nicht voll rekonstituierten Enzyms unter Standardtestbedingungen (25), d. n. auch in Anwesenheit von DNA, zu keiner Aktivitätssteigerung führt, während Aliquote aus demselben Rekonstitutionsansatz, welcher ohne DNA bei 2°C dialysiert wurde, bei 25°C ohne Zusatz von DNA innerhalb weniger Minuten ihre endgültige Aktivität (von 60 % der spezifischen Aktivität des Ausgangsenzyms) erreichten. Da aber in Anwesenheit von DNA das Rekonstruat bei 37°C inkubiert wurde, kann man nicht unbedingt schließen, daß Zusatz von DNA die Rekonstitution hemmt, sondern es ist ebenfalls denkbar, daß die für denaturiertes Protein relativ hohe Inkubationstemperatur von 37°C eine Aktivitätssteigerung während dieser Inkubationszeit vermindert.

3. Kinetik und Temperaturabhängigkeit der Rekonstitution

Schon die Versuche von Lill und Hartmann (48) zeigen, daß die Reaktivierung von Polymerase aus 6,5 M Harnstoff von der Dauer der Dialyse und von der Temperatur abhängt. Um die optimalen Zeit- und Temperaturbedingungen für die Rekonstitution aus isolierten Unter-einheiten zu finden, wurden Kinetiken der Rekonstitution bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Solche kinetischen Untersuchungen könnten auch für das Verständnis der während der Rekonstitution ablaufenden Mechanismen nützlich sein.

In Vorexperimenten sollte analog den Versuchen von Lill und Hartmann (48) an Polymerase nach Inaktivierung in 6 M Harnstoff festgestellt werden, welche Größenordnung für eine optimale Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten bezüglich der erforderlichen Zeit und Temperatur zu erwarten ist. Außerdem läßt sich durch Vergleich der Kinetiken, die vor bzw. nach Präparation der Untereinheiten durchgeführt wurden, feststellen, ob zwischen der Reaktivierung der Polymerase nach Hartmann (48) und der Rekonstitution des Enzyms aus einzelnen Untereinheiten hinsichtlich des Mechanismus und der optimalen Bedingungen Unterschiede bestehen.

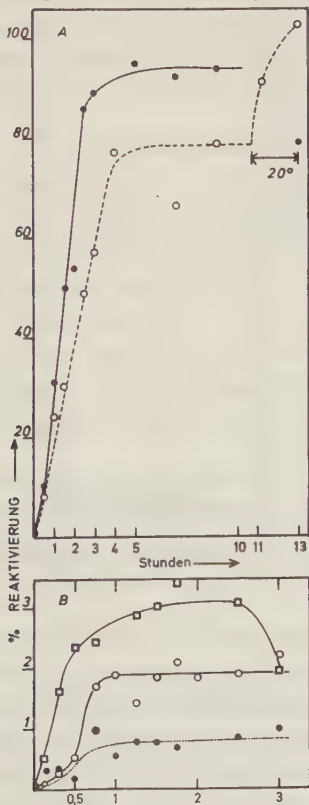


Abb. 7: Kinetik der Reaktivierung von RNA-Polymerase aus E.coli nach Inaktivierung in 6 M Harnstoff. Inaktivierung des Enzyms bei 0°C 1 1/2 Std. in Spaltungspuffer (0,4 M NH_4HCO_3 , 0,01 M Magnesiumacetat, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 6 M Harnstoff, pH 9,0). Anschließend Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer bei den angegebenen Temperaturen. Test unter Standardbedingungen an T₅-DNA. Als Kontrolle wurde unbehandeltes Enzym gegen Rekonstitutionspuffer bei Zimmertemperatur dialysiert.

a) Reaktivierung von Vollenzym
 ○---○ bei 0°C, ●---● bei 20°C
 Die Proteinkonzentration betrug 4,1 mg/ml. Spezifische Aktivität des Ausgangsenzyms 95 nMol AMP-Einbau/mg/Min. Nach 10 Std. 45 Min. wurde der bei 6°C dialysierte Reaktivierungsansatz bei 20°C weiterinkubiert.

b) Reaktivierung von Polymerase bei 30°C

●.....● Vollenzym; Proteinkonzentration 4,1 mg/ml, □—□ Basal-

enzym; Proteinkonzentration 6 mg/ml, im Test wurde die stöchiometrische Menge 6 zugesetzt, ○—○ Basalenzym 6 mg/ml + stöchiometrische Menge 6 im Reaktivierungsansatz. Spezifische Aktivität des Ausgangsenzyms: Vollenzym: 82,5 nMol AMP-Einbau/mg/Min. Basalenzym + stöchiometrische Menge 6: 140 nMol AMP-Einbau/mg/Min.

aus den in Abb. 7 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, daß die Temperatur sowohl bei der Dialyse als auch bei der anschließenden Inkubation auf die Geschwindigkeit der Reaktivierung und die Ausbeute an wiedergewonnener Aktivität Einfluß hat. Es erscheint günstiger, die Dialyse bei einer niedrigen Temperatur durchzuführen und anschließend bei ca. 25 °C zu inkubieren.

Daß dieses Verfahren auch für die Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten zweckmäßig ist, zeigt Abb. 8.

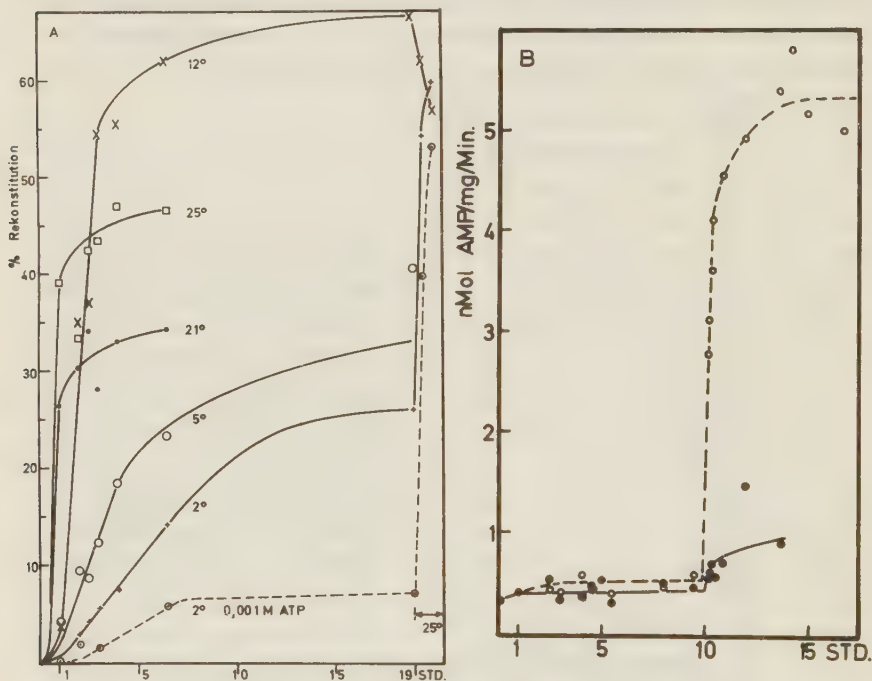


Abb. 8: Kinetik der Rekonstitution von RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten.

Präparation der Untereinheiten durch Cellogelelektrophorese in 6 M Parnstoff, 0,3 M NH_4HCO_3 , 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 0,001 M EDTA, 0,01 M Magnesiumacetat, $\text{pH } 9$, 0,25 Std., 1000 V, 25 mA pro Streifen. Mischung der Untereinheiten in stöchiometrischem Verhältnis und Dialyse bei der angegebenen Temperatur gegen Rekonstitutionspuffer. Test unter Standardbedingungen an T_5 -DNA. Spezifische Aktivität des Ausgangsenzyms: 95 nMol AMP-Einbau/mg/Min.

a) Proteinkonzentration im Rekonstitutionsansatz: 0,29 mg/ml

b) Proteinkonzentration im Rekonstitutionsansatz: 0,8 mg/ml

---○--- Dialyse bei 0°C, 10 Std., anschließend bei 30°C weiterinkubiert

—●— Dialyse bei 30°C, 10 Std., anschließend bei 40°C weiterinkubiert.

Der Verlauf der Kinetik bei Verwendung einzelner Untereinheiten unterscheidet sich nicht von der Reaktivierung der Polymerase ohne Isolierung der Untereinheiten. Die etwas geringere Totalausbeute in Abb. 8a läßt sich durch Inaktivierung eines Teils der Untereinheiten bei der Präparation erklären. Mit steigender Temperatur bei der Dialyse nimmt auch die Rate der Rekonstitution zu, jedoch bei Temperaturen über 12°C nicht die Gesamtausbeute an reaktiviertem bzw. rekonstituiertem Enzym. Trotz der höheren Rate bei 21°C und 25°C ist die Ausbeute bei einer Dialysetemperatur von 12°C optimal. Bei 30°C überwiegt die Inaktivierung der noch nicht rekonstituierten Untereinheiten, so daß trotz der Abhängigkeit der Rekonstitutionsgeschwindigkeit von der Temperatur nur noch eine minimale Enzymaktivität nachgewiesen werden kann (51).

Offenbar müssen die Untereinheiten während der Dialyse erst in einen temperaturstabilen, aber noch inaktiven Zwischenzustand übergeführt werden, was bei 0°C - 5°C bereits möglich ist, bevor ein Erwärmen des Rekonstitutionsansatzes auf 25°C nicht zu einer Inaktivierung führt, sondern die Zufuhr der nötigen Aktivierungsenergie darstellt, damit das Enzym seine für die biologische Aktivität erforderliche Konformation annehmen kann. Die durch nachträgliche Inkubation bei 25°C gewonnene Enzymaktivität ist etwa vergleichbar mit der bei einer Dialysetemperatur von 12°C erreichten Ausbeute.

Der langsame Anstieg der Aktivität während der Dialyse bei 2°C bzw. 5°C könnte auf der Zunahme des Enzymanteils beruhen, welcher während der Dialyse gegen die im Standardtest verwendete Inkubationstemperatur von 37°C bereits stabil geworden ist und während des Tests aktiviert wird.

Möglicherweise stellt aber auch die zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessene Enzymaktivität schon die zu dieser Zeit vorhandene Menge an aktiviertem Enzym dar. Für diese Ansicht spricht, daß die Rate, mit der die Aktivität ansteigt, temperaturabhängig ist. Nach Abb. 8b scheint tatsächlich bei einer Dialysetemperatur von 0°C noch kein aktives Enzym vorzuliegen, wohl aber ein Zwischenprodukt, welches sich nicht unter Testbedingungen, sondern nur durch Inkubation vor

dem Test, d. h. ohne Anwesenheit von DNA aktivieren läßt. Die in diesem Fall geringe Ausbeute von nur 5 % der Ausgangsaktivität beruht entweder auf der relativ hohen Inkubationstemperatur von 30° C oder auf der Qualität der verwendeten Untereinheiten.

Bezüglich des Mechanismus der Rekonstitution ergibt sich aus den Kinetiken:

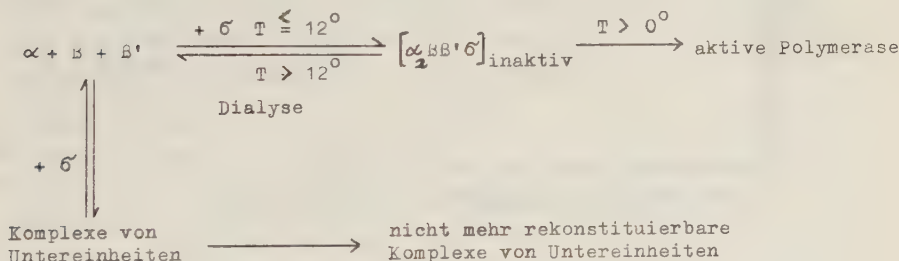
- 1) Schon bei Temperaturen zwischen 0° C und 5° C bildet sich ein enzymatisch inaktives, aber temperaturstabiles Zwischenprodukt, sobald die Harnstoffkonzentration im Verlauf der Dialyse soweit abgesunken ist, daß entsprechende Konformationsänderungen stattfinden können.
- 2) Durch Erwärmen des Rekonstitutionsansatzes auf Temperaturen über 12° C wird die Aktivierungsenergie zugeführt, die zur Umwandlung des Zwischenprodukts in seine enzymatisch aktive und thermodynamisch stabile Form erforderlich ist.
- 3) Die Anwesenheit von ATP hat auf den Verlauf der Kinetik keinen stimulierenden Einfluß, während DNA die Umwandlung des Zwischenprodukts durch die im Aktivitätstest verwendete Temperatur verhindert (vgl. S. 34).

Die Annahme, daß die Rekonstitution der Polymerase in zwei aufeinanderfolgenden Schritten stattfindet, stimmt mit den Ergebnissen aus kinetischen Untersuchungen von Teipel und Koshland (52) überein. Von diesen Autoren wird für die Reaktivierung von sechs Enzymen, die alle aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind, ebenfalls ein Zweistufenmechanismus gefordert. Danach soll die erste Zustandsänderung von der "random coil-Konformation" zu einem Zwischenprodukt die räumliche Struktur des Proteins sehr stark verändern, aber innerhalb 30 - 60 sec. abgeschlossen sein, während die weitere Umwandlung zur enzymatisch aktiven Form langsamer vor sich geht und nur noch von minimalen Konformationsänderungen begleitet wird. Einen ähnlich Ablauf der Rekonstitution beschreiben auch Schachmann (51) und Deal (65) für Aldolase. Welche der beiden Schritte im Verlauf der Rekonstitution zur Zusammenlagerung der Untereinheiten führt, ist noch nicht geklärt. Da aber für die Polymerase die Anwesenheit sämtlicher Untereinheiten schon während der Dialyse erforderlich ist, kann man ver-

muten, daß zur Bildung des Zwischenkomplexes keine der drei essen-
tiellen Untereinheiten fehlen darf. Zu Beginn der Rekonstitutions-
kinetik der Polymerase ist wie bei drei der von Teipel und Koshland
untersuchten Enzyme eine lag-Phase zu beobachten. Daraus könnte man,
wie diese Autoren, auf einen Prozes höherer Ordnung bei der Rekonsti-
tution schließen. Das würde bedeuten, daß sich nur durch kooperatives
Zusammenwirken von α , β und β' ein temperaturstabiler Zwischenkom-
plex bilden kann.

Die bei der Rekonstitution der Polymerase ablaufenden Vorgänge lassen
sich in folgendem Schema zusammenfassen:

Schema III:



4. Einfluß des Mischungsverhältnisses der Untereinheiten im Rekon- stitutionsansatz auf die Ausbeute

In den bisher dargestellten Rekonstitutionsexperimenten waren die
Untereinheiten immer im stöchiometrischen Verhältnis $\alpha : \beta : \beta' : \sigma =$
 $2 : 1 : 1 : 1$ eingesetzt worden. Da aber die Ausbeute an rekonsti-
tuiertem Enzym, bezogen auf die spezifische Ausgangsaktivität häufig
starken Schwankungen unterlag, ist es denkbar, daß ein Teil der Un-
tereinheiten durch Aggregatbildung, Oxydation oder Oberflächendena-
turierung für die Rekonstitution verloren ging. Ein solcher Verlust
müßte sich dann durch Zusatz der betreffenden Untereinheit im Über-
schuß ausgleichen lassen. Zur Ermittlung des optimalen Mischungsver-
hältnisses der Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz wurde deshalb
für jede Untereinheit die sättigende Menge bestimmt.

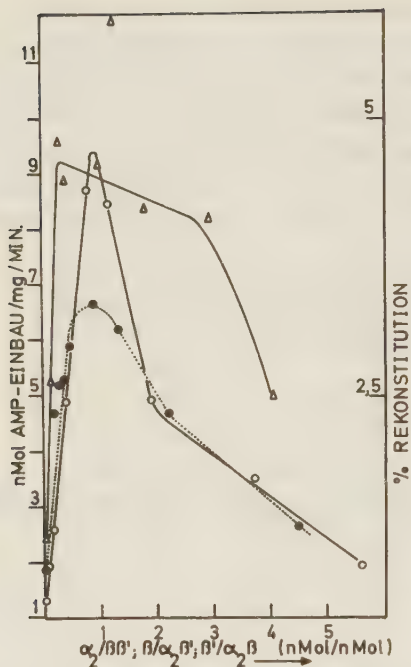


Abb. 9: Abhängigkeit der Ausbeute an rekonstituierter RNA-Polymerase vom Mischungsverhältnis der Untereinheiten. Trennung der Untereinheiten auf Cellogelelektrophorese in 0,15 M NH_4HCO_3 , 6 M Harnstoff, 0,01 M Mg^{2+} -Acetat, 0,02 M β -Mercapto-äthanol, 5 % Glycerin, pH 9,0. Alle Rekonstitutionsansätze enthielten 0 in stöchiometrischer Menge. Für jede Untereinheit wurde die sättigende Menge bestimmt, wobei die Menge der restlichen beiden Untereinheiten konstant gehalten wurde.

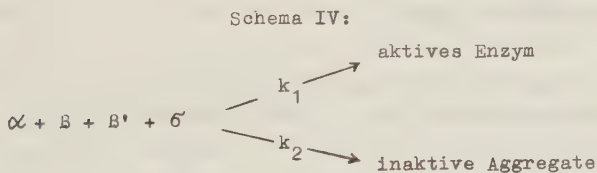
$\Delta-\Delta$: Abszisse nMol α_2 /nMol B/B'
 $\bullet-\bullet-\bullet$: Abszisse nMol B'/α_2 /nMol B
 $\circ-\circ-\circ$: Abszisse nMol B'/α_2 /nMol B

Proteinkonzentration im Rekonstitutionsansatz: α -Sättigung: 0,31 - 0,59 mg/ml, B -Sättigung: 0,38 - 1,1 mg/ml, B' -Sättigung: 0,38 - 1,45 mg/ml. Die Gesamtproteinkonzentration beim Abszissenwert 1 entspricht für α 0,37, für B 0,56 und für B' 0,57 mg/ml. Rekonstitutionstechnik wie in "Material und Methoden" beschrieben. Test auf Enzymaktivität unter Standardbedingungen an T_5 -DNA.

Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse bezüglich der Abhängigkeit der Rekonstitutionsausbeute vom Mischungsverhältnis der Untereinheiten lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) Bis zum Sättigungspunkt ergibt sich für die Rekonstitutionsausbeute eine lineare Abhängigkeit von der Menge der im Unterschuss angebotenen Untereinheit.
- 2) Zur Sättigung, d. h. für die maximale spezifische Aktivität, benötigt man für α 25 %, für B 75 % und für B' 90 - 100 % der stöchiometrischen Menge.
- 3) Für alle Untereinheiten läßt sich feststellen, daß die Menge, welche dem Rekonstitutionsansatz über die Sättigung hinaus zugesetzt wurde, nicht nur die spezifische Aktivität vermindert, sondern auch eine verringerte Gesamtausbeute bewirkt, auch wenn noch lange nicht das stöchiometrische Mischungsverhältnis erreicht ist.

Zur Interpretation dieses Resultats kann man zunächst annehmen, daß im Rekonstitutionsansatz von einer Untereinheit umso weniger benötigt wird, je stabiler diese ist. So ließe sich z. B. erklären, daß schon bei 25 % der stöchiometrischen Menge von α die maximale spezifische Aktivität des Rekonstituts erreicht wird. Oder anders ausgedrückt: Nur 25 % von B und/oder B' sind noch zur Rekonstitution mit α fähig. Da aber andererseits im Falle von B und B' eine weitere Vermehrung des Anteils der im Unterschuß vorhandenen Untereinheit nicht zu einem Anstieg der noch relativ geringen Rekonstitutionsausbeute führt, sondern zu einer Verminderung, muß man schließen, daß die Rate, mit der sich enzymatisch inaktive Komplexe bilden, gegenüber der Rate der Rekonstitution stark zunimmt, sobald die im Sättigungspunkt erreichte Proteinkonzentration überschritten wird. Möglicherweise ist diese kritische Proteinkonzentration außerdem auch noch vom Mischungsverhältnis der Untereinheiten abhängig. Formal ausgedrückt, überlagern sich zwei Vorgänge:



5. Abhängigkeit der Rekonstitutionsausbeute von der Proteinkonzentration

Die im vorausgehenden Abschnitt vermutete Abhängigkeit der Rekonstitutionsausbeute von der Proteinkonzentration ist in Abb. 10 (S. 42) dargestellt.

Die optimale Konzentration des im Rekonstitutat eingesetzten Proteins liegt zwischen 0,2 und 0,3 mg/ml. Eine geringe Erhöhung der Konzentration verringert die Ausbeute schon erheblich. So erklärt sich also auch die in den Sättigungskurven erreichte geringe Ausbeute, denn dort lagen die Proteinkonzentrationen wesentlich höher als es dem Optimum entspricht.

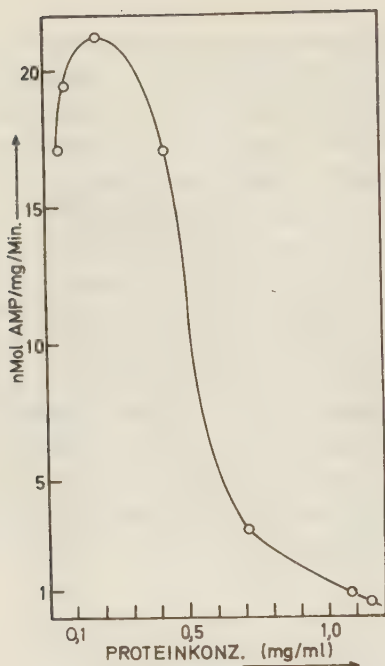


Abb. 10: Abhängigkeit der Ausbeute an RNA-Polymerase nach Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten von der Proteinkonzentration im Rekonstitutionsansatz.

Trennung der Untereinheiten auf Cellogelelektrophoresestreifen in 0,15 M NH_4HCO_3 , 6 M Harnstoff, 0,01 M Mg-Acetat, 0,02 M β -Mercaptoethanol, 5 % Glycerin, pH 9,0. Die Rekonstitutionsansätze enthielten die Untereinheiten in stöchiometrischem Verhältnis. Die Einstellung der angegebenen Proteinkonzentrationen erfolgte durch Verdünnung der aus dem Cellogelelektrophoresestreifen isolierten Proteinlösungen mit dem zur Trennung verwendeten Puffer. Rekonstitutionstechnik wie auf S. 62 beschrieben. Aktivitätstest unter Standardbedingungen an T_5 -DNA.

Diese Erscheinung, daß die Ausbeute der Rekonstitution mit steigender Proteinkonzentration abnimmt, ist nicht auf die Polymerase beschränkt, aber es gibt andererseits auch Enzyme, bei denen die Rekonstitution durch steigende Proteinkonzentrationen gefördert wird. Unter den von Teipel und Kosland (52) untersuchten Enzymen verhalten sich in Bezug auf die Konzentrationsabhängigkeit GPD, MDH und LDH wie Polymerase. Eine weitere Übereinstimmung mit der Polymerase besteht in der Kinetik der Rekonstitution; denn bei diesen Enzymen beginnt die Rekonstitutionskinetik mit einer lag-Phase und die Ausbeute beträgt nur etwa 30 %. Dagegen nimmt nach Teipel und Kosland (52) die Rekonstitutionsausbeute bei Aldolase, Fumarase und Enolase mit steigender Proteinkonzentration zu, die Kinetik beginnt ohne lag-Phase und die Ausbeute beträgt über 80 %. Auch für Ribonuclease und Lysozym nimmt die Rekonstitutionsausbeute mit steigender Proteinkonzentration ab (54).

Die starke Tendenz mancher Proteine, unter denaturierenden Bedingungen oder während der Rekonstitution bei höherer Konzentration Aggregate zu bilden, beruht anscheinend auf der großen Zahl der unter diesen Bedingungen zur Bindung fähigen hydrophoben Seitenketten und SH-Gruppen. Solche Aggregate entstehen also nicht, weil sie die thermodynamisch stabilste Konformation des Proteins darstellen, sondern weil mit zunehmender Proteinkonzentration die Rate der Aggregatbildung größer wird als die, mit der die Polypeptidketten sich richtig zusammenlagern und ihre thermodynamisch stabile dreidimensionale Struktur annehmen können.

Bei solchen Enzymen, deren Rekonstitutionsausbeute trotz steigender Proteinkonzentration zunimmt, besteht anscheinend ein schnelles Gleichgewicht zwischen unspezifischen Aggregaten und der thermodynamisch stabilen nativen Konformation (52), während im Falle der Polymerase, nachdem sich solche Aggregate gebildet haben, kein oder nur ein sehr langsamer Übergang zur biologisch aktiven Form stattfinden kann. Die Ausbeute an rekonstituierter Polymerase wird also entscheidend dadurch bestimmt, daß im Verlauf der Rekonstitution die Untereinheiten sich sofort so renaturieren und zusammenlagern, daß anschließend aus thermodynamischen Gründen nur die native Konformation des biologisch aktiven Enzyms entstehen kann. Aufgrund der hohen Spezifität der "assembly" von nur partiell denaturierten oder nativen Untereinheiten (60) bilden sich die zur Rekonstitution erforderlichen Zwischenkomplexe mit ausreichender Geschwindigkeit schon bei Proteinkonzentrationen um 0,2 mg/ml. Bemerkenswert ist jedoch, daß diese Konzentrationsabhängigkeit nur für die Rekonstitution der Polymerase aus isolierten Untereinheiten zu beobachten ist, während nach einer Inaktivierung des Enzyms ohne Auftrennung in seine Untereinheiten die wiedergewonnene Aktivität von der Proteinkonzentration während der Dialyse unabhängig ist.

Diese unterschiedliche Abhängigkeit der Rekonstitutions- bzw. Reaktivierungsausbeute von der Proteinkonzentration während der Dialyse könnte auf einer unvollständigen Dissoziation des Enzyms in seine Untereinheiten durch 6 M Harnstoff beruhen. Somit wäre die Zahl der Proteinmoleküle mit der Neigung zur unspezifischen Aggregation vor

der elektrophoretischen Trennung geringer als nach Isolierung und anschließender Vereinigung der Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz. Eine unvollständige Spaltung der Polymerase durch 6 M Harnstoff wäre auch eine Erklärung dafür, daß sich die Untereinheiten des Enzyms nur sehr schlecht in einem Saccharosegradienten, der 6 M Harnstoff enthält, trennen lassen (53).

6. Abhängigkeit der Rekonstitutionsausbeute von der Zusammensetzung des Rekonstitutionspuffers

Solange die Untereinheiten der Polymerase (besonders B und B') noch nicht vollständig renaturiert sind, bewirkt die Abnahme der Harnstoffkonzentration durch die Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer eine zunehmende Neigung der Polypeptidketten zum Unlöslichwerden. Durch die Zusammensetzung des Rekonstitutionspuffers lassen sich die Löslichkeit und wahrscheinlich auch die für die Rekonstitution günstigste Konformation der Untereinheiten beeinflussen. Der optimale p_H -Wert des Rekonstitutionspuffers scheint bei 8 zu liegen; denn nach Abb. 3 (S. 18) verringert sich die Ausbeute, wenn man das Rekonstruktat gegen einen Puffer mit p_H 7,5 dialysiert. Wie Abb. 11 zeigt, ergibt ein p_H von 9 trotz optimaler Ionenstärke ebenfalls eine geringere Ausbeute als eine Rekonstitution bei p_H 8.

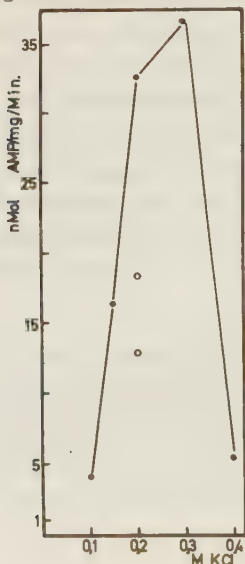


Abb. 11: Ionenstärke-Abhängigkeit der Ausbeute an RNA-Polymerase nach Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten.

Trennung der Untereinheiten auf Cellogelelektrophorese in 0,15 M NH_4HCO_3 , 6 M Harnstoff, 0,02 M β -Mercaptoethanol, 0,01 M Mg-Acetat, p_H 9,0.

Stöchiometrisches Mischungsverhältnis der Untereinheiten, Proteinkonzentration im Rekonstitutionsansatz: 1,2 - 1,6 mg/ml.

Rekonstitutionstechnik: vgl. S. 62

Aktivitätstest unter Standardbedingungen an T_5 -DNA. $\circ$ Wert nach Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer, der 0,2 M KCl enthielt und auf p_H 9,0 eingestellt war.

Die für die Rekonstitution der Polymerase optimale Ionenkonzentration liegt nach Abb. 11 bei 0,25 - 0,3 M KCl. Durch eine zu hohe Ionenstärke wird offenbar nicht nur eine unspezifische Aggregation der Untereinheiten verhindert, sondern auch deren erwünschte Zusammenlagerung.

Der Zusatz von 0,02 M β -Mercaptoäthanol erfolgte aus den gleichen Gründen wie schon im Kapitel zur Präparation der Untereinheiten (S. 19) beschrieben wurde. Daß auch der Rekonstitutionspuffer eine ausreichende Konzentration eines Reduktionsmittels enthalten muß, wurde schon von Lill und Hartmann (48) festgestellt.

Kapitel III: Nachweis der Identität des rekonstituierten Enzyms mit Polymerase

Der nach der Rekonstitution meßbare AMP-Einbau in säurefällbares Material beruht auf Polymeraseaktivität; denn durch Zusatz spezifischer Inhibitoren der Polymerase wie Rifampicin oder Streptolydigin zum Testansatz läßt sich dieser Einbau hemmen (S.52,5*). Außerdem wird die Aktivität eines Rekonstituts, welches nur α , β und β' enthält, durch σ stimuliert. Auch nach Fällung mit 55 %igem Ammonsulfat und anschließender Auflösung des Niederschlags in TMA behält das Rekonstitutionsprodukt seine Aktivität. Bezüglich seiner Stabilität beim Aufbewahren in TMA-Glycerin unterscheidet es sich ebenfalls nicht von unbehandelter Polymerase.

Da jedoch das rekonstituierte Enzym häufig eine wesentlich geringere spezifische Aktivität als das Ausgangsenzym hat, muß man annehmen, daß das Rekonstitut einen Teil der eingesetzten Untereinheiten noch einzeln oder in Form enzymatischen inaktiver Komplexe enthält. Zur Charakterisierung der bei der Rekonstitution entstehenden Produkte und zum Beweis der Identität des rekonstituierten Enzyms mit Polymerase wurde ein Rekonstitutionsansatz, nachdem er dialysiert und inkubiert worden war, auf einen Sucrosegradienten (10 - 30 %) geschichtet und bei hoher Ionenstärke (0,6 M NH_4Cl) parallel zu einem Vergleichsenzym sedimentiert. Die anschließend durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens gewonnenen Fraktionen wurden auf Enzymaktivität getestet (25), und ihre Proteinkonzentration bestimmt (47). Die je einem Proteingipfel entsprechenden Fraktionen des Gradienten wurden zu fünf Hauptfraktionen vereinigt (I - V), und ihre Proteinzusammensetzung auf der Cellogelelektrophorese analysiert.

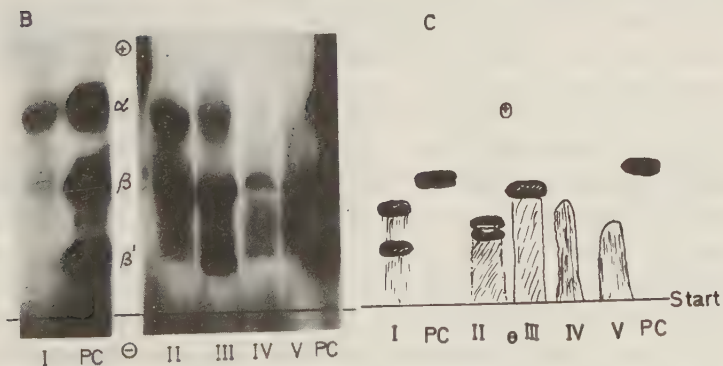
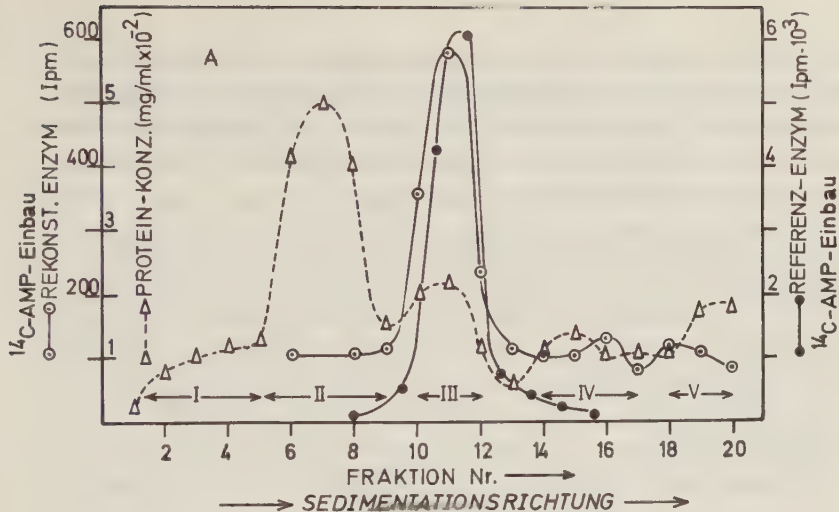
Abb. 12: Analyse der Rekonstitutionsprodukte im Sucrosegradienten und auf Cellogelelektrophorese.

a) Trennung der bei der Rekonstitution von RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten entstehenden Produkte durch Sedimentation im Saccharosegradienten Spinco-Rotor SW 27.1, 44 Std., 27.000 UPM. (10 - 30 % Sucrose, 5 - 10 % Glycerin, 0,6 M NH_4Cl in TMA-Puffer). Es wurden 0,38 ml eines Rekonstitutionsansatzes, die 0,46 mg Protein enthielten auf den Gradienten aufgetragen. Gewinnung der Fraktionen durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens von unten.

●—● Aktivität des parallel zum Rekonstitut sedimentierten Vergleichsenzyms

○—○ Aktivität des rekonstituierten Enzyms

Δ---Δ Proteinkonzentration (Bestimmungsmethode: S.59).



b) Cellogelelektrophorese der vereinigten Fraktionen des Sucrosegradienten (nach Fällung mit 60 % Ammoniumsulfat) in Tris-Harnstoffpuffer bei p_H 9,0. PC = Minimalenzym als Referenz.

c) Cellogelelektrophorese derselben Fraktionen in Neutralpuffer.

Wie Abb. 12 zeigt, sedimentiert das enzymatisch aktive Protein aus dem Rekonstitutat im Sucrosegradienten bei hohem Salz wie das Vergleichsenzym. Darüber hinaus ließ sich aus dem Rekonstitutionsansatz noch Protein abtrennen, welches schneller bzw. langsamer als Polymerase sedimentierte.

In der leichtesten Fraktion I wurde nur α und eine Spur von β und eventuell β' nachgewiesen. Wahrscheinlich handelte es sich um freies α . Das Vorhandensein der übrigen Untereinheiten läßt sich auf unvollständige Trennung von der Nachbarbande zurückführen. Schneller als I aber immer noch langsamer als Polymerase sedimentierte Fraktion II, welche überwiegend aus α und β (im Verhältnis 2 : 1) bestand. Diese Fraktion II enthielt also entweder einen Komplex $\beta\alpha_2$ oder weniger wahrscheinlich, eine Mischung aus den in der Cellogelelektrophorese nachgewiesenen Proteinen.

Da sich nur in Fraktion III, die wie das Vergleichsenzym sedimentierte, Enzymaktivität nachweisen ließ, und nur diese Fraktion das für die Polymerase typische Bandenmuster in der Cellogelelektrophorese zeigt, gilt als eindeutig bewiesen, daß sich Polymerase durch Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten herstellen läßt.

Die Proteinfractionen IV und V sedimentierten schneller als die Polymerase und waren im Test auf AMP-Einbau inaktiv. In der Cellogelelektrophorese erwies sich der überwiegende Anteil des Proteins als β und β' , daneben fand sich eine Spur α und eine zwischen β und β' wandernde Bande, bei der es sich vielleicht um eine veränderte Untereinheit der Polymerase handelt. Sicher liegt das Protein, welches schneller als das Enzym sedimentiert, in Form eines oder mehrerer Komplexe aus den genannten Polypeptiden vor, da diese als einzelne Proteine leichter als das Enzym sein sollten.

Zur weiteren Charakterisierung der Rekonstitutionsprodukte, und um festzustellen wie stark die Proteine im Verlauf der Präparation und Rekonstitution denaturiert worden sind, wurden die Fraktionen I - V nicht nur in harnstoffhaltigem Tris-Puffer, sondern auch in Neutralpuffer auf der Cellogelelektrophorese untersucht (Abb. 12c). Rekonstituiertes Enzym oder Komplexe aus Untereinheiten sollten nämlich

in Neutralpuffer als scharfe Banden wandern. Außerdem ist die elektrophoretische Beweglichkeit in Neutralpuffer ein Zeichen für die Nativität des Proteins. Wie erwartet wandert rekonstituiertes Enzym in Neutralpuffer überwiegend als eine Bande etwa so schnell wie das Vergleichsenzym. Fraktion I zeigte zwei Banden, die α und β (oder α_2 ?) entsprechen würden. Damit wird wahrscheinlich, daß mindestens ein Teil von α als freies Polypeptid vorliegt. Fraktion II erscheint in Neutralpuffer als eine Bande. Demnach handelt es sich um einen Komplex aus α und β ($\beta\alpha_2$?). Außerdem ist ein Teil des Proteins an der Auftragsstelle liegengeblieben, d. h. denaturiert. Die Fraktionen IV und V enthalten überwiegend denaturiertes Protein, welches am Start liegengeblieben ist. Nur ein geringer Anteil hat seine Beweglichkeit in Neutralpuffer erhalten, aber er wandert nicht als scharfe Bande, sondern schmiert als breite Front vom Start weg.

Die Verteilung von $\bar{G}$ ließ sich wegen der zu geringen Konzentration nicht durch Cellogelelektrophorese nachweisen. Aufgrund seiner Fähigkeit, Basalenzym zu stimulieren, konnte es aber wie Tab. 7 zeigt in den Fraktionen I, II und III festgestellt werden.

Tabelle 7: Verteilung von $\bar{G}$ nach Sedimentation eines Rekonstituts im Sucrosegradienten

Basalenzym	Fraktion des Sucrosegradienten	nMol AMP-Einbau	Stimulierung
+	-	2,1	1
+	I	3,9	1,85
-	I	0	-
+	II	6,3	3
-	II	0	-
+	III	10,9	2,16
-	III	6,45	-
+	IV	2,1	1
-	IV	0	-
+	V	2,2	1
-	V	0,1	-

Es wurde die Stimulierung von $3,1 \mu\text{g}$ Basalenzym unter Standardbedingungen an T_5 -DNA getestet.

Wahrscheinlich ist ζ in Fraktion II an den $\alpha_2\beta$ -Komplex gebunden, während Fraktion III ζ -haltiges Vollenzym darstellt. Infolge der Abtrennung der Untereinheiten, die sich nicht an der Rekonstitution beteiligt hatten, erhöhte sich nach dem Sucrosegradienten die spezifische Aktivität des Rekonstituts von 15,2 nMol auf 50 - 100 nMol AMP-Einbau/mg/Min. an T_5 -DNA.

Die Analyse des Produkts der Rekonstitution zeigt also eindeutig, daß die wiedergewonnene Aktivität auf Polymerase zurückzuführen ist. Jedoch läßt sich mittels der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden nichts aussagen über die Identität der räumlichen Struktur der rekonstituierten Polymerase mit der des Ausgangsenzyms. Es erscheint denkbar und wird durch Untersuchungen an einer Reihe anderer Enzyme wahrscheinlich gemacht (66, 67, 68, 69, 70), daß sich durch Rekonstitution in vitro verschiedene enzymatisch aktive Strukturisomere bilden können, während in vivo die Art der Faltung schon durch die an der naszierenden Polypeptidkette erfolgende Stabilisierung einer bestimmten Struktur festgelegt ist.

Vergleicht man die Kinetiken der Rekonstitution bei verschiedenen Temperaturen (S.36) so fällt auf, daß das Enzym, welches bei 12° C dialysiert wurde, zwar sehr schnell sein hohes Plateau erreicht, aber durch Inkubation bei 25° C an Aktivität verliert, während die Rekonstitute, die bei 2° C bzw. 5° C dialysiert wurden, durch Inkubation bei derselben Temperatur eine starke Aktivitätssteigerung erfahren. Vielleicht äußert sich in diesem Fall ein Konformationsunterschied in einer unterschiedlichen Temperaturstabilität der unter verschiedenen Bedingungen rekonstituierten Enzyme.

Kapitel IV: Gemischte Rekonstitution der Polymerase aus isolierten
Untereinheiten als Mittel zur Aufklärung der Funktion
der Untereinheiten in der Transcription

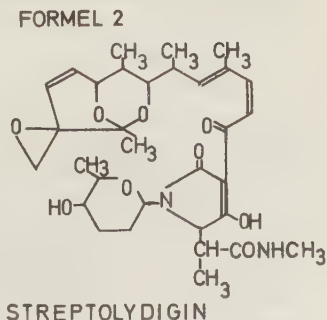
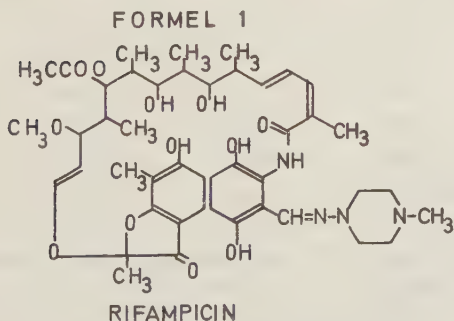
Am Beispiel von Enzymen aus antibiotika-resistenten E.coli-Stämmen soll nun die Anwendbarkeit der Methode der Rekonstitution von Polymerase aus ihren Untereinheiten demonstriert werden.

Um auf diese Weise den Enzymuntereinheiten bestimmte Partialfunktionen zuordnen zu können, müssen vier Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1) Vorhandensein spezifischer Hemmstoffe der Transcription, die unmittelbar am Basalenzym angreifen.
- 2) Kenntnis des gehemmten Reaktionsschrittes.
- 3) Verfügbarkeit von Enzymen aus Bakterien-Mutanten, die gegen diese Inhibitoren resistent sind.
- 4) Eine Modifikation der Polymerase darf nicht die Rekonstitution verhindern.

Für drei verschiedene Schritte der Transcription sind bisher Hemmstoffe bekannt, die unmittelbar am Basalenzym wirken.

- 1) Die Bindung der Polymerase an die DNA wird kompetitiv durch Heparin gehemmt (71).
- 2) Die Initiation der RNA-Synthese wird in nicht kompetitiver Weise durch Rifamycin und dessen Derivate gehemmt (35). Formel I.
- 3) Die Elongation der RNA-Kette läßt sich durch Streptolydigin spezifisch hemmen (72, 73). Formel II.



Da eine Heparin-resistente Polymerase-Mutante wegen der für die Enzymfunktion essentiellen Eigenschaft, an Polyanionen (DNA) zu binden, sehr unwahrscheinlich ist, muß man sich mit solchen Enzymen begnügen, die gegen die Inhibitoren der Initiation bzw. Elongation resistent sind.

Für diese Untersuchungen standen außer Wildtyp-Polymerase Enzyme aus Rifampicin-resistenten (40) und Streptolydigin-resistenten (73) Bakterien zur Verfügung. (Die Rifampicin-resistente Polymerase stammte aus einer von Rabussay isolierten Mutante, die Streptolydigin-resistenten Bakterienstämme RFS 528 und RFS 529 wurden uns freundlicherweise von R. Schleif zur Verfügung gestellt). Am Rifampicin-resistentem Enzym konnte bereits Rabussay (40) zeigen, daß die β -Untereinheit für diese Resistenz verantwortlich, d. h. an der Initiation beteiligt ist. Daher erschien dieses Enzym aus Rifampicin-resistenten E. coli Bakterien geeignet, um die Anwendbarkeit der Methode der gemischten Rekonstitution zu prüfen.

Tabelle 8: Gemischte Rekonstitution von RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten, die aus Rifampicin-resistentem und Rifampicin-sensitivem Enzym gewonnen wurden

	mU./mg rekonstituiertes Minimalenzym		
	- Rifampicin	+ Rifampicin	% resistente Aktivität
sensitives Ausgangsenzym	242	1,5	0,6
resistentes Ausgangsenzym	124	120	97

Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz

$\alpha + \beta + \beta' + \sigma$	52	1,4	2,0
$\alpha_r + \beta_r + \beta'_r + \sigma$	27	25,6	95
$\alpha_r + \beta + \beta' + \sigma$	40	0,6	1,5
$\alpha + \beta_r + \beta' + \sigma$	88	69	78
$\alpha + \beta + \beta'_r + \sigma$	17,5	1,4	8,0

Isolierung der Untereinheiten durch Cellogelelektrophorese in Tris-Harnstoffpuffer bei p_H 8,0. Rekonstitutionstechnik vgl. S.62; Standardtestbedingungen an T_4 -DNA. 25 μ l des Rekonstitutionsansatzes wurden in 0,25 ml getestet und enthielten 0,45 μ g α , α_r ; 0,9 μ g β , β_r ; 0,9 μ g β' , β'_r . Untereinheiten mit dem Index "r" stammen aus Rifampicin-resistentem Enzym.

Sowohl aus Rifampicin-sensitivem Wildtyp-Enzym als auch aus Rifampicin-resistenter Polymerase wurden die Untereinheiten isoliert und anschließend in stöchiometrischen Mengen so zusammen gegeben, daß man alle möglichen Kombinationen von Untereinheiten aus Rifampicin-resistentem und Rifampicin-sensitivem Enzym erhielt. Nach Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer und Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Rekonstitute jeweils mit und ohne Rifampicin auf ihre Aktivität getestet.

Wie Tabelle 8 zeigt, ist das Rekonstruat, welches nur Untereinheiten aus Wildtyp-Polymerase enthält, voll sensitiv gegen Rifampicin, während das, welches ausschließlich Untereinheiten aus Rifampicin-resistenter Polymerase enthält, gegen den Inhibitor voll resistent ist. Außerdem wird deutlich, daß nur solche Rekonstitute, die B aus resistentem Enzym enthalten, gegen Rifampicin resistent sind. Dagegen sind alle Rekonstitute mit B aus sensitivem Enzym auch voll sensitiv gegen Rifampicin.

Mit diesem Ergebnis wurden die Resultate von Rabussay (40) auch für intakte Polymerase bestätigt und die Brauchbarkeit dieser Methode bewiesen.

Für die Streptolydigin-resistenten Enzyme sollte der Effekt weniger ausgeprägt sein, da die Stämme RFS 528 und RFS 529 eine gegen Streptolydigin nur partiell resistente Polymerase enthalten.

Abb. 13 zeigt die Abhängigkeit der RNA-Synthese in vitro von der Streptolydigin-Konzentration für Wildtyp-Enzym und resistentes Enzym.

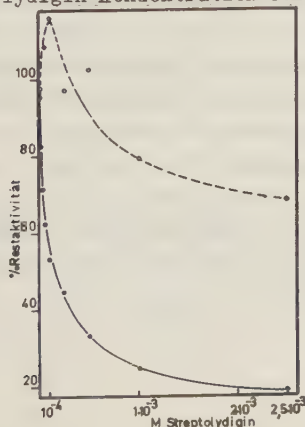


Abb. 13: Abhängigkeit der Aktivität von RNA-Polymerase aus Streptolydigin-sensitiven ●●● und -resistenten ○○○ E. coli Bakterien von der Hemmstoffkonzentration. In 0,250 ml Testvolumen wurden 6 µg sensitives bzw. 5 µg resistentes Enzym eingesetzt.

Daß der Unterschied in der Hemmbarkeit durch Streptolydigin zwischen Rekonstituat, die alle Streptolydigin-resistenten Untereinheiten enthielten, und solchen, mit allen Streptolydigin-sensitiven Untereinheiten, ausreichend ist, zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Gemischte Rekonstitution von RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten von Streptolydigin-sensitivem und Streptolydigin-resistentem Enzym

Untereinheiten im Rekonstitu- tionsansatz	Rekonst.(mU/mg) Streptolydigin (4 mM)		% resist. Aktivität	Rekonst.(mU/mg) Streptolydigin (1 mM)		% resist. Aktivität
	-	+		-	+	
$\alpha + B + B' + \sigma$	65	0,78	1,2	84	1,8	2,1
$\alpha_s + B_s + B'_s + \sigma$	112	13,6	12,1	123	35,2	29,0
$\alpha_s + B + B' + \sigma$	29	0,52	1,8	36	1,1	3,0
$\alpha + B_s + B' + \sigma$	84	10,9	13,0	86	26	30,2
$\alpha + B + B'_s + \sigma$	103	1,25	1,2	113	4,2	3,6
$\alpha + B_s + B'_s + \sigma$	135	19,2	14,2	132	38	29,0
$\alpha_s + B + B'_s + \sigma$	58	1,1	1,9	75	1,2	1,6
$\alpha_s + B_s + B'_s + \sigma$	33	3,5	10,6	31	11,5	36,6

Bedingungen der Präparation der Untereinheiten und der Rekonstitution wie in Tab. 8. Je 5 μ l eines Rekonstituts (nach Fällung mit Ammoniumsulfat) wurden in 0,25 ml Testvolumen eingesetzt und enthielten 1,9 μ g α , α_s ; 3,8 μ g B, B_s ; 3,8 μ g B', B' und 1,9 μ g σ . Untereinheiten mit dem Index "s" stammen aus Streptolydigin-resistentem Enzym.

Wie bei der gemischten Rekonstitution mit Rifampicin-resistenten Untereinheiten wurden auch hier sämtliche möglichen Rekonstitute aus Untereinheiten Streptolydigin-sensitiver und -resistenter Polymerase gebildet und auf die Hemmbarkeit durch den Inhibitor getestet. Dabei stellte sich heraus, daß nur Rekonstitute mit der B Untereinheit aus sensitivem Enzym voll gegen Streptolydigin sensitiv sind, während eine deutliche Restaktivität (bei zwei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen) sich überall dort finden ließ, wo B aus partiell

Streptolydigin-resistentem Enzym enthalten war. Die Herkunft von α und β spielt für die Streptolydigin-Sensitivität oder -Resistenz keine Rolle. Dieselben Ergebnisse konnten auch mit Enzym aus dem partiell Streptolydigin-resistenten Stamm RFS 529 erhalten werden. Damit ist also β nicht nur der Angriffsort für Rifampicin, sondern auch für Streptolydigin.

Es wird jetzt verständlich, daß man die Gene für Rifampicin- bzw. Streptolydigin-Resistenz in enger Nachbarschaft lokalisieren konnte, da jeweils dieselbe Polypeptidkette betroffen ist (74).

Unsere Vorstellung über die Rolle der β -Untereinheit bei der Initiation der RNA-Synthese kann demnach erweitert werden und umfaßt nun auch eine Beteiligung von β bei der Verlängerung der RNA-Kette.

In welcher Beziehung die Elongation durch Streptolydigin beeinflusst wird, läßt sich aus den Ergebnissen von Cassani et al. schließen (75). Danach soll Streptolydigin bei niederen Konzentrationen eine Verlangsamung, bei hohen Konzentrationen eine Hemmung der Verknüpfung von Nucleotidresten zu RNA bewirken. Diesem Effekt ist auch die Ausbildung der Phosphodiesterbindung zwischen den ersten beiden Nucleotiden unterworfen. Streptolydigin wirkt also im Gegensatz zu Rifampicin sowohl in der Initiationsphase als auch am synthetisierenden Enzym. Diese Autoren konnten außerdem zeigen, daß die Polymerase unter Streptolydigin-Einwirkung eine selektiv verminderte Affinität für UTP sowie eine etwas stärkere Bindungsfähigkeit für CTP hat. Besonders bei höheren Hemmstoffkonzentrationen läßt sich auch für ATP und GTP eine nicht kompetitive Hemmung der Substratbindung an das Enzym feststellen. Es wird weiterhin vermutet, daß die Verminderung der Syntheserate durch den Inhibitor je nach der Zusammensetzung der angebotenen Matrize verschieden ist; denn die Konzentration an Streptolydigin, die zu einer 50 %-igen Verminderung der Transcription erforderlich ist, ist bei (dA)_n. (dT)_n zehn mal höher als wenn T₄-DNA als Matrize angeboten wird.

Da außerdem Streptolydigin bei genügend hoher Konzentration und in Anwesenheit von Mg⁺⁺ ähnlich wie ATP auf den Komplex aus Enzym und Matrize (E σ - d(A-T); E σ - T₄-DNA) stabilisierend wirkt, könnte dieser Hemmstoff auch die Translokation der RNA-Polymerase verhindern (76).

Für den Fall, daß der Angriffsort der Inhibitorwirkung sowie der Ort der gehemmten Enzymwirkung in derselben Untereinheit liegen, wenn also das an β gebundene Antibiotikum nicht allosterisch die Funktion anderer Untereinheiten hemmt, muß man der β -Untereinheit viele verschiedene Funktionen zuordnen, über deren Beziehungen zueinander noch keine Aussage möglich ist.

- 1) β ist die einzige Untereinheit der Polymerase, die alle anderen Polymerase-Untereinheiten binden kann; denn nur für β sind Partialkomplexe mit sämtlichen Untereinheiten bekannt.
- 2) β ist an der Initiation beteiligt
 - a) als Vermittler der σ -Wirkung (Komplex $\beta\sigma$)
 - b) bei der Bindung des ersten Ribonucleosidtriphosphats (Hemmung durch Rifampicin).
- 3) Die Elongation erfordert die Aktivität von β
 - a) für die Substratbindung (Hemmung durch Streptolydigin (75))
 - b) zur Translokation (Stabilisierung des Komplexes $E\sigma - d(A-T)$ durch Streptolydigin (76)).

Das würde aber bedeuten, daß eine einzige Polypeptidkette, nämlich β , für einen großen Teil der Aufgaben der Polymerase verantwortlich ist. D. h. die komplexe Struktur des Enzyms ist nicht im Hinblick auf die komplexe Funktion erforderlich. So betrachtet, wären nämlich die übrigen Untereinheiten der Polymerase im Prinzip nichts anderes als Vermittler regulierender Einflüsse auf die RNA-Synthese.

In der Tat beobachtet man matrizen-abhängige Enzyme, die nur aus einer Polypeptidkette bestehen, und zwar nur in solchen Fällen, wo man annehmen kann, daß wegen der hohen Spezifität dieser Enzyme eine weitere Regulation nicht erforderlich ist wie z. B. bei DNA-abhängiger DNA-Polymerase, T_7 - bzw. T_3 -spezifischer RNA-Polymerase (21, 22) und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Mitochondrien (77).

Material und Methoden

1. Bezugsquellen

Bakterien: E. coli B	Merck, Darmstadt
RFS 528; RFS 529	Dr. R. Schleif
GTP, CTP, UTP	Fabst Lab.; Serva
(¹⁴ C) ATP	Amersham/Buchler, Braunschweig
Phosphoenolpyruvat	Boehringer, Mannheim
Pyruvatkinase	Boehringer, Mannheim
Membranfilter	Sartorius, Göttingen
Cellogelstreifen	Chemetron, Milano
Harnstoff	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoäthanol	Fluka, Basel
Salze	Merck, Darmstadt bzw. Riedel de
	Haen, Seelze-Hannover
Tris	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Saccharose, Enzyme grade	Mann Research, New York
EDTA	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt
Rifampicin	Geschenk der Ciba AG, Basel
Streptolydigin	Geschenk von Upjohn Co., Michigan
Hefeextrakt	Difco Labs., Detroit
Nutrientbroth	Difco Labs., Detroit
trockene Celluloseacetat-	Selecta, Schleicher und Schüll
streifen	

2. Zucht von Bakterien

Die Streptolydigin-resistenten Bakterien wurden in 100 l Edelstahlbehältern unter kräftiger Belüftung bei 37° C gezogen. Ernten der Bakterien bei einem Zelltitert von 9×10^8 /ml durch Zugabe von Eis und Abzentrifugieren in einer Padberg-Durchlaufzentrifuge (40 000 UpM).

Nährmedium für Streptolydigin-resistente Bakterien (g/l):

Nutrient broth	8	
Pepton aus Kasein	5	
K_2HPO_4	3,68	
KH_2PO_4	1,35	
NaCl	3,5	
Hefeextrakt	5	
Fraser-Mix	50 ml/l	Fraser-Mix:
Glukose	5	3000 g Glycerin
		3,3 g $CaCl_2$
		1 g Gelatine
		100 g NH_4Cl
		30 g $MgSO_4 \cdot 4H_2O$
		ad 5 l H_2O

3. Zucht und Reinigung von T_4 - und T_5 -Phagen

Die entsprechenden Wirtsbakterien (für T_4 -Phagen: E. coli CR 63, für T_5 -Phagen: E. coli B) wurden in 15 l Flaschen unter Belüftung in einem Medium nach Fraser und Jerrel (78), angereichert mit 0,5 % Glucose und 1 % Pepton, bei 37° C bis zu $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml gezogen. Die Infektion mit Phagen erfolgte mit einer Multiplizität von 1 - 5. Es wurde 2 - 3 Stunden unter Kulturbedingungen weiter inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit einigen ml Chloroform versetzt und mit Eis auf 0° C abgekühlt. Zelltrümmer wurden durch Filtration des Lysats durch eine Kieselgurschicht abgetrennt und die Phagen aus dem Filtrat in einer Spinco-Zentrifuge bei 19 000 UpM im Rotor 19 1 Std. abzentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig in TMA-Puffer gelöst. Die weitere Reinigung der Phagen erfolgte durch Zentrifugation in einem CsCl-Stufengradienten (79). Durch Dialyse gegen TMA wurde das CsCl wieder entfernt.

4. Pufferlösungen

TMA: 0,05 M Tris-Acetat, p_H 7,5; 0,01 M $MgAc_2$; 0,022 M NH_4Cl ;
0,001 M β -Mercaptoäthanol; 0,0001 M EDTA

Harnstoffhaltige Puffer für die Cellogelelektrophorese
= Spaltungspuffer:

- a) Borat-Puffer: 0,5 M Borsäure; 0,001 M EDTA; 0,01 M β -Mercaptoäthanol; 6 M Harnstoff; p_H 9,0 bzw. 8,0 mit NH_4OH eingestellt.
- b) Tris-Puffer: 0,5 M Tris-Acetat; 0,01 M $MgAc_2$; 0,02 M β -Mercaptoäthanol; 0,001 M EDTA; 20 % (V/V) Glycerin; 6 M Harnstoff; p_H 8,0 bzw. 9,0 mit Eisessig eingestellt.
- c) Ammoniumbi-carbonat-Puffer: 0,2 M NH_4HCO_3 ; 0,01 M $MgAc_2$; 0,02 M β -Mercaptoäthanol; 0,001 M EDTA; 5 % (V/V) Glycerin; 6 M Harnstoff; p_H wurde auf 9,0 eingestellt mit NH_4OH .

Neutralpuffer für die Cellogelelektrophorese

0,4 M Tris-Acetat; 0,01 M Mg-Acetat; 0,001 M EDTA; 0,02 M β -Mercaptoäthanol, p_H 7,9.

Rekonstitutionspuffer

0,05 M Tris-Acetat; 0,01 M $MgAc_2$; 0,001 M EDTA; 0,02 M β -Mercaptoäthanol; 0,2 M KCl; 20 % (V/V) Glycerin; p_H wurde mit Eisessig eingestellt.

5. Quantitative Bestimmungsmethoden

DNA-Bestimmung: Nach Dische (80) oder durch Messung der Extinktion bei 260 nm; $E_{260} = 20 \text{ (mg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1})$.

Proteinbestimmung: Da die Lowry-Reaktion (81) bei den zur Präparation von Untereinheiten und zur Rekonstitution erforderlichen Konzentrationen an β -Mercaptoäthanol sehr hohe Nullwerte ergab, wurde eine Mikromethode entwickelt, mit welcher sich Proteinmengen ab 0,25 μg auch aus Lösungen, deren Lowry-Reaktion zu hohe Nullwerte ergibt, bestimmen lassen: 1 bis 5 μl Proteinlösung (= 0,5 bis 5 μg Protein) werden auf trockene Celluloseacetatstreifen pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Proteinlösung werden die Streifen 10 Min. mit 0,24 % Amidoschwarz in 45 % Methanol; 45 % Wasser; 10 % Eisessig gefärbt, anschließend in derselben Lösung ohne Farbstoff entfärbt

und getrocknet. Die blau gefärbten Flecke werden ausgestanzt und in 0,5 ml 80 % Eisessig; 10 % Ameisensäure; 10 % Wasser; 1 % TCA aufgelöst. Die Extinktion dieser Lösung wird bei 630 nm gemessen. Als Standard dient eine Rinderserumalbuminlösung, die in der gleichen Weise behandelt wurde. Eine mögliche Ungenauigkeit dieser Proteinbestimmungsmethode liegt in der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit verschiedener Proteine für Amidoschwarz. Sie kann aber für Routinemessungen vernachlässigt oder durch geeignete Standardisierung ausgeschaltet werden. Bei Verwendung von 0,2 % fast green anstelle von Amidoschwarz im selben Lösungsmittel haben auch unterschiedliche Proteine für den Farbstoff die gleiche Affinität. Die Extinktion wird dann ebenfalls bei 630 nm gemessen.

Extinktionsbestimmungen im UV- und sichtbaren Bereich wurden mit einem Zeiss Spektrophotometer PMQ II durchgeführt.

Radioaktivitätsmessung erfolgte für ^{14}C entweder in einem Tracerlab Automatic II mit Gas-Durchflußzählrohr (Zählausbeute 25 %) oder in einem Packard Tricarb Flüssigkeitsscintillations-Spektrometer Modell 3380.

Scintillationsflüssigkeit: Toluol-Scintillator: 4,5 g PPO

1,5 g POPOP

1 1 Toluol

RNA-Synthese unter Standardtestbedingungen:

Der Testansatz enthielt in 0,250 ml je 0,25 μMol CTP, GTP, UTP; 0,25 μMol ^{14}C ATP; 30 μMol NH_4Cl ; 7,5 μMol Mg-Acetat; 7,5 μMol Tris-Acetat; pH 7,9; 5 μg PEP-Kinase; 0,24 mg PEP; 25 - 50 μg T_4 - bzw. T_5 -DNA; RNA-Polymerase in den jeweils angegebenen Mengen; soviel Wasser, daß das Gesamtvolumen 0,250 ml betrug. Die Lösungen wurden bei 0° C zusammenpipettiert, gemischt und bei 37° C 20 Min. inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml Eiswasser wird die Synthese abgebrochen. Die Fällung der neusynthetisierten, ^{14}C markierten RNA erfolgt durch Zusatz von 2 ml 10 %iger TCA. Durch Filtration des Ansatzes über Membranfilter und mindestens dreimaliges Waschen mit 5 %iger TCA wird überschüssiges ^{14}C ATP entfernt. Nach dem Trocknen der Filter wird die Radioaktivität gemessen.

6. Präparative Methoden

RNA-Polymerase wurde nach der Methode von Zillig et al. (82) gewonnen. Die Trennung von Minimalenzym und 6' erfolgte nach der von Burgess angegebenen Methode (31) durch Chromatographie an Phosphorylcellulose.

DNA wurde aus gereinigten T₄- bzw. T₅-Phagen gewonnen. Durch viermaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen puffergesättigten Phenols (0,01 M Tris-Acetat; p_H 7,9; 0,001 M EDTA; 0,08 % Oxycholin), viermaliges Ausschütteln mit Chloroform-Oktanol (9 : 1) und viermaliges Ausschütteln mit Chloroform wird das Protein abgetrennt. Durch Dialyse gegen 0,01 M Tris-Acetat; 0,001 M EDTA; p_H 7,9 bei 4° C wird das restliche Chloroform aus der DNA-Lösung entfernt.

7. Spezielle Methoden

Cellogelelektrophorese

Celluloseacetatstreifen (17 x 4 cm) wurden in Elektrophoresepuffer (S. 59) (Borat-Harnstoff für analytische Trennung, Tris-Acetat- oder Ammoniumbicarbonat-Harnstoff für präparative Trennung) äquilibriert, wobei der Puffer dreimal nach jeweils 10 Min. gewechselt wurde. Cellogelblöcke (4 mm dick) zur präparativen Trennung wurden über Nacht in Elektrophoresepuffer eingeweicht. Die Streifen (oder Blöcke) wurden mit der glänzenden, undurchlässigen Seite auf die gekühlte und mit Teflon überzogene Messingplatte einer feuchten Elektrophoresekkammer gelegt. Überschüssiger Puffer wurde mit Filterpapier abgetrocknet. Das Auftragen der Probe erfolgte mit einer weichen Polyäthylenkapillare. Als Stromzuführung dienten zwei puffergetränkte Filterpapierstreifen (oder 4 mm starker Karton) bei Verwendung von Cellogelblöcken). Die Elektrophorese dauerte für analytische Trennung ca. 1 Std., für präparative Trennung auf Cellogelstreifen 2,5 - 3 Std. (auf Cellogelblöcken 10 Std.). Die Trennung auf Cellogelstreifen erfolgte bei ca. 1000 V, 20 - 25 mA pro Streifen (Cellogelblöcke 400 V, 100 mA).

Präparation der Untereinheiten der Polymerase

Die präparative Trennung der Untereinheiten der Polymerase erfolgte durch Cellogelelektrophorese in Tris- oder Ammoniumbicarbonat-Harnstoffpuffer. Vor dem Auftragen wurde die Probe (Minimal- oder Vollenzym) gegen Spaltungspuffer (S. 59), der nur 0,01 M Tris-Acetat enthielt oder gegen TMA-Glycerin-Puffer (50 : 50) (S. 58) dialysiert. Eine Dissoziation des Enzyms vor der Elektrophorese ist nur bei Auftragung größerer Proteinmengen z. B. auf Cellogelblöcke (ca. 30 mg in 1 ml) erforderlich. Auf Cellogelstreifen wurde ca. 1 mg Protein in 20 - 40 μ l Volumen in einer Breite von 3 - 4 cm aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden von den Cellogelstreifen je 2 3 - 5 mm breite Randstreifen abgeschnitten (von Cellogelblöcken wurde mit trockener Celluloseacetatfolie ein Abdruck gemacht) mit 0,25 % Amidoschwarz in 50 % Methanol, 40 % Wasser, 10 % Essig angefärbt und im selben Lösungsmittel ohne Farbstoff entfärbt. Durch Anlegen der Randstreifen (bzw. des Abdrucks) mit den sichtbar gemachten Proteinbanden an den unbehandelten Streifen (oder Block) ließen sich dort die Banden lokalisieren und ausschneiden. Die ausgeschnittenen Cellogelstückchen wurden in Polyäthylentrichter gesteckt, die in Zentrifugenröhrchen passen (Amicon) und 5 Min. bei 20.000 UpM in einer Servallzentrifuge zentrifugiert. Über 95 % der im Cellogelstückchen enthaltenen Pufferlösung konnten so gewonnen werden. Mit dem Puffer erhielt man ca. 50 % der aufgetragenen Proteinmenge wieder. Die Proteinkonzentration betrug pro Untereinheit 0,5 - 1 mg/ml.

Technik der Rekonstitution

Die Untereinheiten wurden in stöchiometrischen Mengen zusammengegeben. (Es empfiehlt sich vor dem Mischen der Untereinheiten eine Proteinkonzentration von jeweils 0,2 - 0,3 mg/ml durch Verdünnen mit Elektrophoresepuffer einzustellen). Dem Rekonstitutionsansatz wurden eine Spur Silicon Antischaum (Wacker) zur Vermeidung von Oberflächendenaturierung und 10 % Glycerin zugesetzt, damit sich bei der Dialyse gegen glycerinhaltigen Rekonstitutionspuffer das Volumen nicht zu stark verringerte. Das Volumen eines Rekonstitutionsansatzes betrug 40 - 100 μ l. Es wurde über Nacht bei 0° C gegen Rekonstitutionspuffer (S. 59) dialysiert und anschließend weitere 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die RNA-Polymerase läßt sich nach Inaktivierung in 6 M Harnstoff bis zu 100 % der Ausgangsaktivität reaktivieren.
2. Durch Cellogelelektrophorese in harnstoffhaltigem Puffer können reine Enzym-Untereinheiten gewonnen werden, welche sich wieder zu aktiver Polymerase zusammensetzen lassen.
3. Die Bedingungen, unter denen das Enzym dissoziiert wird, beeinflussen die Rekonstitutionsausbeute:
Tris-Acetat- und vor allem Ammoniumbicarbonat-Puffer ergeben rekonstituierbare Untereinheiten, während Borat-Ionen die Rekonstitution hemmen. Nach Spaltung des Enzyms bei p_H 9 erhält man die beste Ausbeute an rekonstituiertem Enzym. Die Anwesenheit von Magnesium-Ionen oder Glycerin wirkt sich nur dann auf die Rekonstituierbarkeit aus, wenn die Spaltung des Enzyms in Tris-Puffer oder bei einem p_H unter 9 erfolgt.
4. In Anwesenheit von 6 M Harnstoff verlieren die Untereinheiten ihre Fähigkeit zur Rekonstitution, wenn man sie bei 0° C aufbewahrt. α und α' werden erst nach einigen Tagen, β und β' innerhalb weniger Stunden inaktiviert. Diese Inaktivierung der Untereinheiten kann durch Einfrieren verhindert werden. Es wird die Möglichkeit diskutiert, daß die Untereinheiten bei der Enzymspaltung nur partiell denaturiert werden, und daß Reste der nativen Struktur Voraussetzung für die Rekonstituierbarkeit sind.
5. Die Rekonstitution der RNA-Polymerase aus isolierten Untereinheiten erfolgt durch Dialyse gegen harnstofffreien Puffer. Die Ausbeute an rekonstituiertem Enzym beträgt durchschnittlich 30 - 60 % der spezifischen Ausgangsaktivität.
6. Zur Rekonstitution des Enzyms ist die gleichzeitige Anwesenheit von α , β und β' während der Dialyse erforderlich. Daraus kann man auf einen kooperativen Prozeß beim Zusammentreten der Untereinheiten zu funktionsfähigem Enzym schließen.

7. Bei Rekonstitution aus Untereinheiten, die bei p_H 8 gewonnen wurden, ist die Anwesenheit von σ ebenfalls essentiell. Nach Spaltung der Polymerase bei p_H 9,0 wirkt σ auf die Rekonstitution um den Faktor 2,5 stimulierend.
8. Für die Rekonstitution der Polymerase aus ihren Untereinheiten sind keine weiteren Proteine erforderlich. Die in der Aminosäuresequenz der Polypeptidketten enthaltene Information reicht für die Wiederherstellung der nativen Enzymstruktur aus.
9. ATP und DNA haben keinen stimulierenden Einfluß auf die Rekonstitution.
10. Die Geschwindigkeit der Rekonstitution ist temperaturabhängig, aber die Ausbeute an rekonstituiertem Enzym ist am größten, wenn man durch Dialyse bei $0^\circ - 5^\circ$ C einen temperaturstabilen inaktiven Zwischenkomplex herstellt, der sich durch Inkubation über 12° C in die biologisch aktive Form umwandelt.
11. Für jede Untereinheit wurde die sättigende Menge bestimmt, die zur Herstellung der maximalen spezifischen Aktivität erforderlich ist. Sie beträgt für α 25 %, für β 75 % und für β' 90 - 100 % der stöchiometrischen Menge.
12. Die Rekonstitutionsausbeute nimmt mit steigender Proteinkonzentration ab. Die optimale Proteinkonzentration liegt zwischen 0,2 und 0,3 mg/ml.
13. Das p_H -Optimum des Rekonstitutionspuffers liegt bei 8, die optimale Salzkonzentration bei 0,25 M KCl.
14. Die rekonstituierte Polymerase ist identisch mit dem Ausgangsenzym. Außerdem entstehen bei der Rekonstitution verschiedene enzymatisch inaktive Komplexe aus Enzym-Untereinheiten.
15. Am Beispiel von Polymerasen aus Rifampicin- bzw. Streptolydiginresistenten E.coli-Stämmen wird die Anwendbarkeit der Rekonstitution aus isolierten Untereinheiten zur Aufklärung der Funktion der Untereinheiten in der Transcription gezeigt.

16. Die bisher mit der gemischten Rekonstitution untersuchten Mutanten-Enzyme zeigen sowohl für Rifampicin als auch für Streptolydigin, daß β für die Antibiotikaresistenz verantwortlich ist.
17. Es wird die Funktion von β bei den durch Rifampicin bzw. Streptolydigin hemmbaren Schritten der Transscription diskutiert.
18. Es wird eine Mikromethode zur Proteinbestimmung beschrieben, die sich auch für Proteinlösungen eignet, deren Lowry-Reaktion zu hohe Nullwerte ergibt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarthy, M. J. Exp. Med. 72, 137 (1944)
2. Jacob, F., Monod, J. J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
3. Bremer, S., Jacob, F. und Meselson, M. Nature 190, 576 (1961)
4. Weiss, S.B., Gladstone, L. J. Amer. Chem. Soc. 81, 4118 (1959)
5. Hurwitz, J., Bressler, A., Diring, R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 15 (1960)
6. Hurwitz, J. und August, J.T. Progr. Nucl. Acid Res. 1, 59 (1963)
7. Maitra, U. und Hurwitz, J. J. Biol. Chem. 242, 4897 (1967)
8. Zillig, W., Fuchs, E., Walter, G., Milette, R.L. und Priess, H. in The Biochemistry of Virus Replication, Universitetsforlaget, Oslo, p. 37 (1968)
9. Hayashi, M., Hayashi, M.N. und Spiegelman, S. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 50, 664 (1963)
10. Bautz, E.K.F. und Hall, B.D. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48, 400 (1962)
11. Szybalski, W., Kubinski, H. und Sheldrick, P. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 123 (1966)
12. Bautz, E.K.F., Dunn, J.J., Bautz, F.A., Schmidt, D.A. und Mazatis, J. (1970) in RNA-Polymerase and Transcription p. 90 (L. Silvestri, Ed.) North Holland Publishing Company Amsterdam, London
13. Travers, A.A. und Burgess R.R. Nature 222, 537 (1969)
14. Davison, J., Pilarski, L.M. und Echols, H. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 168 (1969)
15. Zubay, G., Schwartz, D. und Beckwith, J. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66, 104 (1970)
16. Roberts, J.W. Nature 224, 1168 (1969)
17. Hayward, W.S. und Green, M.M. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 64, 962 (1969)
18. De Crombrughe, B., Chen, B., Gottesman, M., Pastan, I., Varmus, H., Emmer, M. und Perlman, R.L. Nature New Biol. 230, 37 (1971)
19. Walter, G., Seifert, W. und Zillig, W. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 240 (1968)
20. Travers, A.A. Nature 223, 1107 (1969)
21. Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, L. Nature 228, 227 (1970)
22. Dunn, J.J., Bautz, F.A., Bautz, E.K.F. Nature New Biol. 230, 94 (1971)

23. Bolle, A., Epstein, R., Salser, W., Geiduschek, E.P. J.Mol.Biol. 33,339(68)
24. Fultz, J. und Geiduschek, E.P. J.Mol.Biol. 42,489(1970)
25. Zillig, W., Fuchs, E. und Milette, R.L. in Progr. Nucl. Acid Res. (Eds. G.L. Cantoni and D.R. Davies) Harper and Row, New York (1966) p. 323
26. Richardson, J.P. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55,1616(1966)
27. Friess, H. und Zillig, W. Biochem. Biophys. Acta 140,540(1967)
28. Zillig, W., Fuchs, E., Palm, P., Rabussay, D. und Zechel, K. in RNA-Polymerase and Transcription (Ed. L. Silvestri) North Holland, Amsterdam p. 151, (1970)
29. Burgess, R.R. J. Biol.Chem. 244,6168(1969)
30. Fuchs, E. unveröffentlicht (1968)
31. Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K.F. Nature 221,43(1969)
32. Travers, A.A. und Burgess, R.R. Nature 222,537(1969)
33. Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V.S., Palm, P., Heil, A., Seifert, W., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35,47(1970)
34. Schachner, M., Seifert, W. und Zillig, W. Europ. J. Bioch. 22,520(1971)
35. Seifert, W., Rabussay, D. und Zillig, W. Febs-Letters 16,175(1971)
36. Sippel, A., Hartmann, G. Biochem. Biophys. Acta 157,218(1968)
37. Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K. und Staehelin, M. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61,667(1968)
38. Di Mauro, E., Snyder, L., Marino, P., Lambertini, A., Coppo, A. und Tocchi-Valetini, G.P. Nature 222,533(1969)
39. Rabussay, D. Dissertation, München (1970)
40. Rabussay, D. und Zillig, W. Febs-Letters 5,104(1969)
41. Von der Helm, K. Dissertation, München (1969)
42. Wu, C.W. und Goldthwait, D.A. Biochemistry 8,4458(1969)
43. Sethi, V.S., Zillig, W. und Bauer, H. Febs-Letters 6,339(1970)
44. Sethi, V.S., Zillig, W. und Bauer, H. Febs-Letters 8,236(1970)
45. Losick, R., Shorestein, R.G., Sonenshein, A.L. Nature 227,910(1970)
46. Palm, P. (1970) unveröffentlicht
47. Heil, A., Zillig, W. Febs-Letters 11,165(1970)

48. Lill, U., Hartmann, G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39,930(1970)
49. Sund, H. und Heber, K. Angew. Chem. Intern. Ed. Engl. 5,231(1966)
50. Jela, M., White, F.H.Jr. und Anfinsen, C.B. Science 125,691(1957)
51. Schachmann, H.K. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28,409(1963)
52. Teipel, J.W., Koshland, D.E.Jr. Biochemistry 10,793(1971)
53. Zechel, K. Dissertation, München (1971)
54. Epstein, C.J., Goldberger, R.P. und Anfinsen, C.B. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28,439(1963)
55. Weber, K., Kuter, D.J. J. Biol. Chem. 246,4504(1971)
56. Tanford, C. Advan. Protein Chem. 23,121(1968)
57. Chilson, O.P., Kitto, G.B., Kaplan, N.O. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53,1006(1965)
58. v. Hippel, P. und Schleich, T. in Structure and Stability of Biol. Macromolecules 2 p. 417 (Eds. S.N. Timasheff and G. Fasman) Marcel Dekker Inc. New York (1969)
59. Hagel, P., Gerding, J.J.T., Fieggen, W. und Bloemendahl, H. Biochem. Biophys. Acta 243,366(1971)
60. Cook, R.A., Koshland, A.E.Jr. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 64,247(1969)
61. Traub, P., Nomwa, M. J. Mol. Biol. 40,391(1969)
62. Sethi, V.S. (1969) unveröffentlicht
63. Scrutton, M.C., Wu, C.W. und Goldthwait, A. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68,2497(1971)
64. Vallee, B.L. Federation Proc. 20,71(1961)
65. Deal, W.C., Rutter, W.J. und Van Holde, K.E. Biochemistry 2,246 (1963)
66. Kitto, G.B., Wassarman, P.M. und Kaplan, N.O. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56,578(1966)
67. Kitto, G.B., Stolzenbach, F.E. und Kaplan, N.O. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38,31(1970)
68. Chilson, O.P., Kitto, G.B., Pudles, J. und Kaplan, N.O. J. Biol. Chem. 241,2431(1966)
69. Schechter, A.N. und Epstein, C.J. Science 159,997(1968)
70. Mann, K.G. und Vestling, C.S. Biochem. Biophys. Acta 159,567(1968)
71. Walter, G., Zillig, W., Palm, P. und Fuchs, E. Eur. J. Biochem. 3,194(1967)
72. Sidhikol, C., Erbstoesser, J.W. und Weissblum, B.J. Bacteriol. 99, 151(1969)

73. Schleif, R. Nature 223,1068(1969)
74. Tocchini-Valentini, G.P., Marino, P. und Colvill, A.J.
Nature 220,275(1968)
75. Cassani, G., Burgess, R.R., Goodman, H.M. und Gold, L.
Nature New Biol. 230,197(1971)
76. Von der Helm, K., Krakow, J.S. Nature New Biol. 235,82(1972)
77. Künzel, H., Schäfer, K.P., Nature New Biol. 231,265(1971)
78. Frazer, D. und Jerrel, E.A. J.Biol. Chem. 205,291(1953)
79. Schweiger, M. Dissertation, München (1968)
80. Dische, Z. Mikrochemie 8,4(1930)
81. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.
J. Biol. Chem. 193,265(1951)
82. Zillig, W., Eichel, K. und Halowachs, H.J. Z. physiol. Chem.
351,221(1970)
83. Laemmli, U.K. Nature 227, 680 (1970)

LEBENS LAUF

9. 9. 1940	geboren in München
1946 - 1951	Volksschule in Lorch (Rhein) und Moosburg (Lkr. Freising)
1951 - 1953	Klenze Oberrealschule München
1953 - 1957	Gisela Oberrealschule München
1957 - 1960	Staatl. Landschulheim Marquartstein
13. 7. 1960	Reifeprüfung
1960 - 1967	Studium der Medizin an der Universität München
22. 6. 1967	Medizinisches Staatsexamen
15. 7. 1967 -	Medizinalassistent am Kreiskranken-
30. 5. 1968	haus Altötting
Seit 1. 6. 1968	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. W. Zillig

